



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

WILSON DIAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOGENOTÓXICA DE
ANÁLOGOS DE TAUMATINAS-LIKE DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.)
WALP.]**

Recife
2022

WILSON DIAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOGENOTÓXICA DE
ANÁLOGOS DE TAUMATINAS-LIKE DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.)
WALP.]**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciências
Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia;
Biologia química para a saúde.

Orientadora: Dr.^a Ana Maria Benko Iseppon
Coorientadora: Dr.^a Lívía Maria Batista Vilela

Recife
2022

Oliveira, Wilson Dias de

Avaliação da atividade antimicrobiana e citogenotóxica de análogos de Taumatinas-Like e Feijão-Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] / Wilson Dias de Oliveira. - 2022.

69 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon.

Coorientadora: Profa. Dra. Lívia Maria Batista Vilela.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. I. Agentes anti-infecciosos. 2. Leguminosas. 3. Feijão-caupi. I. Benko-Iseppon, Ana Maria (orientadora). II. Vilela, Lívia Maria Batista (coorientadora). III. Título.

579.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-098-2022

WILSON DIAS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CITOGENOTÓXICA DE
ANÁLOGOS DE TAUMATINAS-LIKE DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.)
WALP.]**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciências
Biológicas.

Aprovado em: 25/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dr^a. Ana Christina Brasileiro Vidal (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Carlos André dos Santos Silva (Examinador Externo)
IRCCS Materno Infante Burlo Garofolo

A minha mãe **Luzimar Dias** e **Amigos**, bem como a minhas primeiras coorientadoras **Flávia Czekalski** e **Mitalle Matos**, pelo amor incondicional, e por terem abraçado meus sonhos como se fossem deles próprios.

GRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha mãe **Luzimar Dias**, pelo apoio incondicional e por fazer-me sentir que sempre terei um lar para encontrar os melhores sentimentos.

Às Professoras **Lidiane Amorim** e **Valesca Pandolfi**, por acreditarem no meu potencial e no ano de 2014, por terem proporcionado meu ingresso no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegeta (LGBV), meus sinceros agradecimentos.

Às minhas duas primeiras coorientadoras, **Flávia Czekalski** e **Mitalle Matos**, muito do que carrego hoje, é fruto da vivência, conselhos e do trabalho em equipe, a vocês, reservo o meu mais puro agradecimento.

À **Livía Maria Vilela**, por toda a paciência, pelo suporte durante todo o processo experimental do trabalho e pelo conhecimento trocado.

À nossa amada, querida e eterna **Silvany Araujo**, pelo carinho, apoio, conselhos, e conhecimento compartilhado.

À minha Orientadora Prof.^a Dr.^a **Ana Maria Benko Iseppon**, que me acompanha desde meu primeiro contato com a pesquisa científica durante todos esses anos. Serei eternamente grato pela compreensão, dedicação e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À todos que fazem parte do LGBV. Por se tratar de uma equipe grande, é difícil citar nomes sem esquecer alguém que de alguma forma teve um papel importante nesta caminhada. Assim, o melhor é pular esta etapa de citação e guardar todos no coração, fazendo parte da minha memória e respeito. Em especial à **Palloma Oliveira** pela ajuda nas montagem dos experimentos.

À todos os órgãos de fomento (CAPES e CNPq) e em especial a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (**FACEPE**) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu concluísse essa nova etapa!

Meus sinceros obrigado!

RESUMO

O uso desordenado de antibióticos tem aumentado e vem se tornando um grande problema de saúde pública, podendo gerar microrganismos resistentes aos fármacos tradicionais. Em contrapartida, novos antimicrobianos de origem vegetal com diferentes vias de ação têm sido estudados. Este trabalho tem por objetivo desenvolver e avaliar peptídeos vegetais bioinspirados em thaumatin-like de *V. unguiculata* (VuLTPs), evidenciando suas características funcionais e toxicidade. Foram utilizadas ferramentas de predição de atividade antimicrobiana no banco de dados CAMPr3 e no Toxipred. O desenho racional foi conduzido com objetivo de manter a atividade antimicrobiana e minimizar a toxicidade. A modelagem 3D foi realizada por *threading* e a estabilidade dos modelos pela simulação em dinâmica molecular (DM). Foram realizados ensaios antimicrobianos contra cepas bacterianas, bem como potencial citotóxico e genotóxico, através do ensaio de MTT e teste do micronúcleo. Os resultados de predição revelaram que PVuLTP1, PVuLTP2, PVuLTP3 e PVuLTP4 apresentaram atividade antimicrobiana e sem toxicidade detectada. Todos os modelos mostraram-se estáveis nas análises em DM. PVuLTP1 apresentou concentração mínima inibitória (CMI) contra *Acinetobacter baumannii* na concentração de 32 µg/mL, enquanto PVuLTP3 e PVuLTP4 em 512 µg/mL e PVuLTP4 a 1024 µg/mL para esta mesma cepa. PVuLTP1 e PVuLTP4 não apresentaram danos significativos a linhagem celular (L929) testadas nos ensaios citotóxicos e genotóxicos nas concentrações com atividade antimicrobiana. Dessa forma, o desenho racional foi promissor para o desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas. Considerando os resultados, PVuLTPs tem potencial e devem ser testadas com doses terapêuticas seguras para uso em terapias alternativas de interesse à saúde humana.

Palavras-chave: Atividade Antibacteriana; Citotoxicidade; Genotoxicidade; Micronúcleo; PR-5.

ABSTRACT

The disordered use of antibiotics has increased and has become a major public health problem, which can generate microorganisms resistant to traditional drugs. On the other hand, new antimicrobials of plant origin with different routes of action have been studied. This work aims to develop and evaluate plant peptides bioinspired by thaumatin-like from *V. unguiculata* (VuLTPs), evidencing their functional characteristics and toxicity. Antimicrobial activity prediction tools were used in the CAMPr3 database and in Toxipred. The rational design was conducted with the aim of maintaining antimicrobial activity and minimizing toxicity. The 3D modeling was performed by threading and the stability of the models by molecular dynamics (DM) simulation. Antimicrobial assays were performed against bacterial strains, as well as cytotoxic and genotoxic potential, through the MTT assay and the micronucleus test. The prediction results revealed that PVuLTP1, PVuLTP2, PVuLTP3 and PVuLTP4 showed antimicrobial activity and no toxicity was detected. All models proved to be stable in the DM analyses. PVuLTP1 showed minimum inhibitory concentration (MIC) against *Acinetobacter baumannii* at a concentration of 32 µg/mL, while PVuLTP3 and PVuLTP4 at 512 µg/mL and PVuLTP4 at 1024 µg/mL for this same strain. PVuLTP1 and PVuLTP4 did not show significant damage to the cell line (L929) tested in cytotoxic and genotoxic assays at concentrations with antimicrobial activity. Thus, the rational design was promising for the development of new antimicrobial molecules. Considering the results, PVuLTPs have potential and should be tested with safe therapeutic doses for use in alternative therapies of interest to human health.

Keywords: Antibacterial Activity; Cytotoxicity; Genotoxicity; Micronucleus; PR-5.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formas de interação de AMP com a membrana plasmática. O AMP está representado como um espiral, os resíduos com carga positiva estão representados em azul e os resíduos restantes são representados em amarelo. A – Estágios iniciais de ação incluem o ataque à membrana plasmática. B – Inserção na superfície da membrana. C- Peptídeos de pequeno tamanho permeiam a membrana plasmática	25
Figura 2 - Possíveis alvos intracelulares que peptídeos antimicrobianos podem atuar	26
Figura 3 - Mecanismos de ação dos AMPs. A) Modelo de barril; B) Poro toroidal e C) Modelo de tapete	27
Figura 4 - Esquema do modo de ação dos peptídeos antimicrobianos referente ao modelo de Shai-Matsuzaki-Huang	28
Figura 5 - Modelagem tridimensional dos peptídeos realizada no I-Tasser.	38
Figura 6 - Potencial de superfície eletrostático dos modelos teórico tridimensional de PVuTLPs. Regiões catiônicas em azul e aniônicas em vermelho	39
Figura 7 - Representação dos quatro modelos teóricos após análises de DM. Em (A), o desvio da raiz quadrática média (RMSD). Em (B) a flutuação da raiz quadrática média (RMSF).....	40
Figura 8 - Representação dos quatro modelos teóricos após análises do b-factor. As cores quentes (Vermelho, laranja e amarelo) representam regiões de alta vibrações, enquanto as cores frias (Azul escuro, azul claro e verde) são regiões mais rígidas.	41
Figura 9 - Representação da análise do Raio do giro (A) e do número de ligações de hidrogênio (B) dos quatro modelos teóricos das PVuTLPs racionalmente modificadas.....	42
Figura 10 - Modelagem tridimensional dos peptídeos. Em verde, modelos antes da dinâmica molecular. Em verde, estruturas após a análise de dinâmica molecular ...	42
Figura 11 - Viabilidade celular dos peptídeos PVuTLPs em células de macrófagos de camundongo NC (Controle Negativo) e CP (Controle Positivo). Em A: PVuTLP1, B: PVuTLP2, C: PVuTLP3 e D: PVuTLP4	44
Figura 12 - Alterações encontradas no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN). É apontado em (A) Micronúcleo, (B) Broto nuclear e (C) Ponte nucleoplasmática	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das proteínas relacionadas à patogênese (PR) e suas principais propriedades reportadas	16
Tabela 2 - Predição de classificação dos modelos usando o algoritmo Artificial Neural Network (ANN) dos preditores on-line CAMPR3, iAMP-2L, DBAASP3.0 e ADAM. ...	37
Tabela 3 - Predição de atividade antimicrobiana usando os quatro algoritmos do preditor CAMPR3 e o ToxinPred para toxicidade. Support Vector Machine (SVM), Random Forest Classifier (RFC) e Discriminant Analysis Classifier (DAC)	38
Tabela 4 - Predição de atividade contra espécies microbianas usando o servidor DBAASP 3.0	38
Tabela 5 - Predição da atividade antimicrobiana in vitro do peptídeo PVuTLP1 contra cepas bacterianas e seu valor de MIC (Concentração Inibitória Mínima)	43
Tabela 6 - Alterações nucleares em células de macrófagos de camundongo (L929) após exposição ao peptídeo PVuTLP1	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPs - Peptídeos Antimicrobianos

BLASTp - Busca em bancos de dados a partir da sequência de aminoácidos

CAPs - Peptídeos Antimicrobianos Catiônicos

LTPs - Proteínas Transportadoras de Lipídios

MIC - Concentração inibitória mínima

NCBI - Centro Nacional de Informação Biotecnológica

PR - Proteínas relacionadas aos patógenos

UV - Luz ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	GERAL.....	14
2.2	ESPECÍFICOS.....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	PROTEÍNAS PR E A CLASSIFICAÇÃO DAS THAUMATIN-LIKE	15
3.2	THAUMATIN-LIKE	17
3.2.1	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS	17
3.2.2	THAUMATIN-LIKE E SUAS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS	18
3.3	PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM PLANTAS	19
3.4	FAMÍLIA FABACEAE E O GÊNERO <i>Vigna</i>	20
3.5	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) WALP.: USO E IMPORTÂNCIA MEDICINAL.....	21
3.6	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E MECANISMOS DE AÇÃO DOS AMPS	23
3.7	DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS	29
3.8	PEPTÍDEOS E SUAS APLICAÇÕES.....	31
4	PEPTÍDEOS BIOINSPIRADOS EM <i>THAUMATIN-LIKE PROTEIN</i> DE <i>Vigna unguiculata</i>: DESENHO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE	33
5	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A - REGRAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BIOCHIMIE	60
	ANEXO B - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO	67

1 INTRODUÇÃO

O aparecimento de linhagens de bactérias multi-resistentes, fato reconhecido a partir dos anos 80, demonstrou a necessidade de uma busca por diferentes alternativas de antibióticos sintéticos (LERMINIAUX et al. 2019). Atualmente, antibióticos baseados em peptídeos vêm sendo amplamente considerados como uma resposta viável no enfrentamento do crescente problema da resistência a drogas convencionais. Os peptídeos antimicrobianos (*Antimicrobial Peptides*, AMPs) são pequenos peptídeos essenciais para a resposta imune inata de organismos de todos os filos, mostrando atividade contra uma ampla gama de agentes patogênicos, como bactérias, fungos e vírus (SANTOS-SILVA et al. 2021).

Recentes estudos mostraram que vários peptídeos são expressos em espécies vegetais, sendo possível que eles atuem em sinergismo para melhorar a resposta imune contra patógenos. Assim, alguns peptídeos antimicrobianos vêm também sendo avaliados como agentes terapêuticos tanto para animais quanto para humanos (MADIGAN, 2016). Esses peptídeos têm atraído o interesse de pequenas companhias farmacêuticas e biotecnológicas no mundo, objetivando à produção de moléculas terapêuticas amplo espectro para comercialização (LUEPKE et al. 2017).

Entretanto, desde a década de 1990, vários métodos têm sido aplicados para o desenvolvimento racional de peptídeos antimicrobianos, a fim de gerar análogos com atividade melhorada, buscando reduzir suas limitações e aumentar suas vantagens. A identificação e desenvolvimento de AMPs são assistidos por ferramentas computacionais, as quais desempenham um papel crucial nesta área. A descoberta do papel das propriedades físico-químicas dessas moléculas permitiu a elaboração de métodos para a predição destas moléculas. Por sua vez, a predição pode conduzir a identificação de AMPs, antes de sua síntese ou expressão em sistemas biológicas (PORTO; SILVA; FRANCO, 2012).

Apesar do potencial biotecnológico atribuído a essas moléculas, fazem-se necessários estudos adicionais para avaliar seu potencial toxicológico. Neste cenário, existem várias metodologias utilizadas para a testagem da viabilidade ou proliferação celular após exposição direta ou indireta para essas moléculas. Entre os compostos de tetrazólio, o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é o mais comumente usado, esse ensaio é considerado o “padrão ouro” para testes de

citotoxicidade (NGA et al. 2020; GHASEMI et al. 2021). Após a verificação da viabilidade celular, é indispensável a realização de ensaios que visem identificar possíveis danos causados a nível de DNA. Neste caso, a genotoxicidade é a capacidade que certas substâncias têm de causar mudanças no material genético de organismos expostos a elas, esses possíveis danos podem ser analisados por meio do teste de micronúcleo (MN) (MOSESSO et al. 2019; SOMMER et al. 2020).

Mediante isso, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e explorar o potencial antimicrobiano de peptídeos antimicrobianos bioinspirados em proteínas da classe Thaumatin-Like Proteins (TLPs) identificadas no genoma e transcriptoma do Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*), a fim de fornecer conhecimento sobre suas principais características funcionais e toxicidade celular.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver e avaliar peptídeos vegetais bioinspirados em *Thaumatococcus*-like proteins (TLPs) identificados no genoma e transcriptoma do feijão-caupi [*V. unguiculata* (L.) Walp.], fornecendo conhecimentos sobre suas principais características funcionais e toxicidade.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar regiões de domínios conservados nas sequências de *Thaumatococcus*-like a partir de candidatos depositados em banco de dados de acesso privado.
- Realizar predição *in silico* do potencial antimicrobiano a partir de regiões conservadas.
- Desenhar racionalmente dois ou mais peptídeos bioinspirados em *Thaumatococcus*-like.
- Predizer o potencial de toxicidade dos peptídeos desenhados.
- Gerar modelos tridimensionais e avaliar suas estabilidades a partir das simulações em dinâmica molecular.
- Sintetizar pelo menos um peptídeo previamente desenhado racionalmente.
- Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do(s) peptídeo(s) sintetizado(s) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de relevante interesse para saúde pública.
- Analisar *in vitro* o potencial tóxico dos peptídeos sintetizados em nível celular, bem como alterações no DNA (cito e genotoxicidade).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROTEÍNAS PR E A CLASSIFICAÇÃO DAS THAUMATIN-LIKE

Os vegetais possuem mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa ao ataque de patógenos. Esses mecanismos apresentam-se como barreiras físicas e bioquímicas à penetração dos patógenos, englobando substâncias que vão da capacidade de inibição do crescimento até a geração de condições adversas à sua sobrevivência no hospedeiro. O modo como esses mecanismos irão atuar, varia de acordo com a resposta do vegetal em relação ao tecido/órgão afetado, dependendo da nutrição e das condições ambientais na qual a planta está submetida (STANGARLIN et al. 2011). Como barreira bioquímica existe uma família de proteínas relacionadas à patogênese relacionadas à defesa contra patógenos, denominada PR (*Pathogenesis Related*) as quais são induzidas após infecções ou estresse (BOWLES, 1990; ALI et al. 2018). Elas garantem resistência tanto local quanto sistêmica em resposta a infecções, após o reconhecimento dos elicitores do patógeno (ULLUH et al. 2018; CHEN et al. 2019).

Com base na sua estrutura e propriedades funcionais, as proteínas PR foram classificadas em 17 famílias (Tabela 1), considerando sua homologia, similaridade, estrutura primária ou terciária e atividade biológica (CHRISTENSEN et al. 2002; BENKO-ISEPPON et al. 2010; SUDISHA et al. 2012). Além disso, foram identificadas mais duas famílias, PR-18 e PR-19. A PR-18 compreende um carboidrato oxidase induzida por fungo ou ácido salicílico purificado de girassol, a qual atua aumentando a resistência de plantas transgênicas de tabaco contra a infecção causada por bactérias (CUSTERS et al. 2004; ARORA et al. 2020). Por sua vez, a PR-19 foi identificada em *Pinus sylvestris* L. com atividade antimicrobiana. Conhecidas por sua ação antifúngica membros das PR-19 se ligam as glucanas da parede celular fúngica, interferindo no crescimento das hifas (SOORIYAARACHCHI et al. 2011; JABER et al. 2018).

Tabela 1 - Classificação das proteínas relacionadas à patogênese (PR) e suas principais propriedades reportadas.

Família	Origem	Tamanho (kDa)	Propriedades	Referência
PR-1	Tabaco PR-1	15	Antifúngico	ANTONIW et al. (1980)
PR-2	Tabaco PR-2	30	β -1,3-Glucanase	ANTONIW et al. (1980)
PR-3	Tabaco P,Q	25-30	Quitinase (classe I,II, IV,V,VI,VII)	VAN LOON (1982)
PR-4	Tabaco R	14-20	Quitinase (classe I,II)	VAN LOON (1982)
PR-5	Tabaco S	25	Taumatina-like	VAN LOON (1982)
PR-6	Inibidor I de tomate	8	Inibidor de protease	GREEN e RYAN (1972)
PR-7	Tomate 69	75	Endoproteinase	VERA e CONEJERO (1988)
PR-8	Quitinase de pepino	28	Quitinase tipo 3	MÉTRAUX, STREIT e STAUB (1988)
PR-9	Tabaco	35	Peroxidase	LAGRIMINI et al. (1987)
PR-10	Salsa PR-1	17	Ribonuclease-like	SOMSSICH et al. (1986)
PR-11	Quitinase tipo V	40	Quitinase tipo I	MELCHERS et al. (1994)
PR-12	Ps-AFP 3 Rabanete	5	Defensina	TERRAS et al. (1995)
PR-13	THIS2-1 Arabidopsis	5	Tioninas	EPPLE, APEL e BOHLMANN (1995)
PR-14	Cevada TLP4	9	Proteínas transferidoras de lipídios	GARCÍA-OLMEDO et al. (1995)
PR-15	Cevada OxOLP (Germina)	20	Oxidase Oxalato	COLLINGE e THORDALCHRISTENSEN (1995)
PR-16	Cevada OxOLP	20	Oxidase-like Oxalate	WEI et al. (1998)
PR-17	Tabaco PRp27	27	Desconhecida	OKUSHIMA et al. (2000)
PR-18	Girassol	60	Antibacteriana	CUSTERS et al. (2004)
PR-19	Pinheiro silvestre	14	Antimicrobiana	SOORIYAARACHCHI et al. (2011)

Fonte: Adaptado de Sels, et al. (2008) e Singh, et al. (2013).

As cinco primeiras famílias de proteínas PR (PR-1 a PR-5) foram descobertas em 1990, sendo inicialmente identificadas intra e extracelularmente em tecidos de vegetais ou em cultura de células, após o tratamento com elicitores ou ataque de patógenos (BOWLES, 1990). Dentre aquelas que possuem atividade antifúngica, as PR-5 merecem destaque pela sua diversidade funcional (SAEIDI et al. 2020), atividade antifúngica desencadeada por infecções, que promovem um rápido aumento de sua expressão (JESUS-PIRES et al. 2020). Tais proteínas são responsáveis por atuarem na permeabilização da membrana plasmática do patógeno invasor, causando uma perturbação na bicamada lipídica que pode resultar na criação de poros transmembranares (EL-KEREAMY et al. 2011).

As proteínas PR-5 do tipo TLP (*Thaumatin-Like Proteins*) são isoformas básicas, que têm esse nome por sua sequência ter alta homologia com uma proteína de sabor adocicado, denominada taumatina, isolada de *Thaumatococcus danielli* (CORNELISSEN et al. 1986; LIU et al. 2019). Algumas *Thaumatin-like* apresentam atividade endo-beta-1,3-glucanase. Estudos mostram que essa atividade está relacionada a uma fenda (ou *pocket*) com resíduos de aminoácidos carregados eletronegativamente, favorecendo a interação com a membrana dos patógenos (MENUBOUAOUICHE et al. 2003; PERUTKA et al. 2019).

3.2 THAUMATIN-LIKE

3.2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

TLPs (*Thaumatin-like protein*) são polipeptídeos de aproximadamente 206 aminoácidos (21 a 26 KDa), que apresentam uma grande similaridade à sequência original da Taumatina, como abordado no tópico proteínas PR e a classificação das Thaumatin-like (VAN DER WEL e LOEWE 1972; VELAZHAHAN et al. 1999).

As *Thaumatin-like* apresentam 16 resíduos de cisteínas altamente conservados e podem exibir em sua estrutura secundária até oito ligações dissulfeto. As estruturas secundárias, além de garantir maior estabilidade a TLP mediante condições extremas de pH e temperatura (BREITENEDER. 2004; FIERENS et al. 2009). Em relação a sua carga superficial, as TLPs podem ser ácidas, básicas ou neutras, além disso, essas moléculas possuem um peptídeo sinal na região N-terminal, responsável por direcionar a proteína madura para uma via secretora particular (LIU et al. 2010). Tratam-se de proteínas relativamente maiores do que os AMPs tradicionais (que possuem aproximadamente 12 a 50 aminoácidos). Portanto, levando em consideração seu peso molecular e quantidade de aminoácidos, normalmente não são classificadas nesse grupo, embora se destaquem pela alta conservação de seus resíduos de cisteína (SILVA et al. 2019).

As TLPs apresentam diferentes domínios conservados que são responsáveis pela formação de uma pequena região (*cleft*) entre os motivos I e II, o qual está relacionado à atividade enzimática dessas proteínas. Essa pequena região presente nas TLPs de vegetais é ácida, característica conferida por cinco cisteínas conservadas que formam o motivo REDDD (SHARMA et al. 2020). Outras TLPs apresentam

deleções de aminoácidos em um de seus domínios que culminam na perda do *cleft* ácido típico. Essas proteínas são conhecidas como Small TLPs (sTLPs) encontradas em cereais, coníferas e fungos (PETRE et al. 2011).

3.2.2 THAUMATIN-LIKE E SUAS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

As proteínas do tipo TLP formam um grupo de moléculas com acentuado potencial biotecnológico. Mesmo assim, são poucos os estudos que exploram sua atividade antimicrobiana. Decorrente disso, muitos pesquisadores tem reunido esforços para explorar o potencial biotecnológico dessas proteínas (SINGH et al. 2017; SUN et al. 2020).

Chen et al. (2020) com objetivo de avaliar a estrutura e atividade pró-inflamatória da LcTLP (*Thaumatococcal Protein de Litchi chinensis*), observaram que esta molécula promoveu a expressão gênica e produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 β e também aumentou a expressão de p65, que é um componente chave das vias de sinalização do fator nuclear- κ B. Além disso, os níveis de citocinas anti-inflamatórias interleucina-10 e fator de crescimento transformador- β 1 aumentaram após a estimulação com LcTLP, sendo esta proteína de grande interesse para a indústria farmacêutica e cosmética.

Ao analisar a atividade antifúngica da Pe-TLP em plantas transgênicas de *Populus deltoides*, Sun et al. (2020) observaram que embora a própria Pe-TLP não apresentasse efeito direto sobre a cepa patogênica testada, as plantas transgênicas com níveis de expressão mais elevados de Pe-TLP mostraram maior resistência contra manchas foliares. Isso sugere a utilização da Pe-TLP como base no desenvolvimento de produtos bioativos para utilização na agricultura. Yasmin et al. (2017) também relatam a atividade antifúngica de uma TLP da fruta Banana Basrai, onde a proteína que foi clonada e expressa em *Escherichia coli*, a TLP-Basrai conseguiu inibir o crescimento de *Aspergillus fumigatus*, tendo sua ação potencializada quando combinada com o fármaco comercial Anfotericina B. Aqui, mais uma vez, fica claro que as TLPs são candidatas potenciais a uso alternativo em tratamentos terapêuticos, bem como na produção de fármacos.

Além disso, foi relatado que a interação redox-dependente entre TLPs e o β -glucano (polissacarídeo que exibe efeito positivo para o organismo melhorando a

absorção de nutrientes e o sistema imunológico, podendo ser encontrado em plantas e na parede celular de fungos e bactérias) influencia a qualidade do malte da cevada. Singh et al (2017) relatam que a TLP8 (*thaumatin-like protein 8*) se liga ao (1, 3, 1, 4)- β -D glucano insolúvel em extratos de grãos, facilitando a remoção desse polissacarídeo indesejável durante a maltagem, um dos estágios da fabricação da cerveja. Sendo assim, a *thaumatin-like protein 8* pode fornecer uma base para melhorias futuras no processo final de fabricação da cerveja.

3.3 PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM PLANTAS

Os vegetais podem ser uma importante fonte de substâncias bioativas devido à sua capacidade em biossintetizar uma grande variabilidade de produtos naturais de classes e estruturas diversas. Estas substâncias podem inspirar a busca racional de novos protótipos a fármacos *in natura* ou via síntese de análogos estruturais com maior atividade farmacológica e até menor toxicidade (NEWMAN & CRAGG, 2016; DANG et al. 2020).

Os peptídeos antimicrobianos representam um mecanismo de defesa primitivo e são encontrados desde os organismos simples, como bactérias, até os mais complexos, como animais, incluindo-se os humanos (OSTBERG, 2005; BECHINGER, 2006; STRAUS; HANCOCK, 2006; DANG et al. 2020).

A superexpressão de alguns peptídeos promove aumento da resistência das plantas aos patógenos. Mesmo com o surgimento de microrganismos resistentes, esses peptídeos podem atuar diminuindo o grau de virulência para um nível significativamente menor (TITARENKO et al. 1997; LÓPEZ-SOLANILLA et al. 1998; GARCIA-OLMEDO et al. 2001, LI et al. 2020). Além disso, um grande número de análises de expressão gênica de alguns peptídeos revelou que uma única interação entre planta/patógeno é capaz de restabelecer ou silenciar centenas de genes, muitos deles conhecidos, enquanto outros permanecem a serem descritos (BENKO-ISEPPON et al. 2010; SANTOS-SILVA et al. 2020).

Sendo assim, os AMPs são de grande importância na defesa das plantas como parte da barreira constitutiva, assim como em resposta induzida por infecções, podendo também interagir sinergicamente ou até mesmo antagonicamente (GARCIA-OLMEDO et al. 2001; JI et al. 2017). Essas moléculas vegetais apresentam um vasto espectro de atividades *in vitro* contra fitopatógenos, sendo a grande maioria delas

ativas contra fungos, enquanto outras são inibidores de bactérias e insetos herbívoros (ODINTSOVA & EGOROV, 2012).

Alguns estudos determinam que alguns AMPs não atuam apenas como agentes antibacterianos diretos essas moléculas podem ser importantes efetores e moduladores do sistema imunológico e podem regular as respostas imunológicas por meio de várias atividades, as quais serão abordados nos próximos tópicos (LI et al. 2019; SANTOS-SILVA et al. 2020).

3.4 FAMÍLIA FABACEAE E O GÊNERO *Vigna*

A família Leguminosae (Fabaceae) destaca-se entre os grupos vegetais por ser a terceira maior família entre as fanerógamas, em números de representantes, ficando atrás apenas das Orchidaceae e Asteraceae (PASTORINO et al. 2018). São reconhecidos 727 gêneros, além de um total de 19.325 espécies (AZANI et al. 2017), tratando-se de um dos grupos mais diversificados da flora mundial, com distribuição cosmopolita e espécies nativas em todos os continentes, à exceção da Antártida. As espécies pertencentes à família Leguminosae são distribuídas em seis subfamílias: Faboideae, Duparquetioideae, Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae e Dialioideae (SAMSON et al. 2020).

No Brasil, a família apresenta-se como o grupo vegetal mais rico em diversidade de espécies. São registrados cerca de 211 gêneros e aproximadamente 2.700 espécies de leguminosas, distribuídas em todos os domínios fitogeográficos do país (AZANI et al. 2017). Estima-se que o Cerrado seja o bioma que abriga a maior diversidade de espécies já descritas (28,68%), seguido pela Amazônia (27,57%), Mata Atlântica (23,25%), Caatinga (15,28%), Pampa (2,69%) e Pantanal (2,54%) (LIMA et al. 2012). Os representantes desta família botânica possuem diversos hábitos de crescimento, incluindo árvores de pequeno, médio e grande porte, ervas anuais ou perenes, arbustos e lianas, entre outros (SOUZA e LORENZI, 2005; SOUZA e SOUZA, 2011).

Dentre os gêneros de relevância socioeconômica, o gênero *Vigna* abrange cerca de 120 espécies aceitas, com distribuição pantropical, com espécies cultivadas na África, Ásia, Américas Central e do Sul e na Austrália (GHAFOO et al. 2001). A maioria das espécies desse gênero é endêmica da África, sugerindo que a evolução e dispersão do gênero ocorreram a partir deste continente (FREIRE-FILHO, 2011).

Nesse sentido, o feijão-caupi (*V. unguiculata*), também conhecido como feijão de corda, feijão verde ou feijão macassar, é uma leguminosa de origem africana de grande importância alimentar para as regiões tropicais e subtropicais do mundo. A espécie apresenta quase todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62%), minerais e vitaminas, além da sua grande quantidade de fibras e baixos teores de gordura, desempenhando assim um papel importante na nutrição humana (ANDRADE JÚNIOR et al. 2002). Além disso, a literatura mostra que o teor de proteína desta leguminosa varia de 22% a 25%, a depender da cultivar (SANTOS et al. 2012). A grande maioria dessas proteínas é representada por globulinas (65% a 80%) e albuminas (4% a 12%), do total encontrado na semente (SANTANA et al. 2019; TORRES et al. 2019).

No Brasil, sua produção constitui em uma das principais alternativas econômicas e sociais, principalmente na agricultura familiar das regiões Norte e Nordeste, por ser considerada a principal cultura de subsistência das populações rurais. Embora, também seja muito cultivada por pequenos, médios e grandes produtores do Centro-Oeste (MALHEIRO et al. 2008; SANTANA et al. 2019; TORRES et al. 2019). A área de produção do feijão-caupi em todo território mundial chega a aproximadamente 12,3 milhões de hectares, cenário onde a África teve a maior contribuição, segundo a *Food and Agricultural Organization* (FAO, 2018).

O feijão-caupi vem ganhando maior expressão econômica em algumas regiões do Brasil, devido a seu expressivo consumo, tendo em vista também que o plantio está deixando de ocorrer apenas em nível de subsistência para atingir áreas maiores, se adequando aos padrões agrônômicos favoráveis ao desenvolvimento da cultura, melhorando ainda mais sua produtividade (AGEITEC, 2018).

3.5 *Vigna unguiculata* (L.) WALP.: USO E IMPORTÂNCIA MEDICINAL

Além de ser predominantemente usado na alimentação humana, as sementes torradas de feijão-caupi (*V. unguiculata*) são usadas na medicina popular para tratar neurite, insônia, lapsos de memória, dispepsia (SINGH et al. 2015).

Além disso, o feijão macassar é usado no tratamento para estomatite, úlceras da córnea e doença celíaca. Seu alto teor nutricional, com média de 62% de carboidratos, vitaminas e aminoácidos, 23% de proteínas e baixo teor de gordura 2%, faz esta espécie ser uma importante fonte de nutrientes para alimentação humana e

animal (SAMSON et al. 2020). Alguns dos aminoácidos presentes nesse vegetal desempenham um papel importante na manutenção celular. Também, sabe-se que as sementes do feijão-caupi têm funções cardioprotetoras, destacando-se também na prevenção de doenças cardiovasculares. A decocção das folhas de *V. unguiculata* é usada para tratar hiperacidez, náuseas e vômitos (SINGH et al., 2015).

Os grãos de *V. unguiculata* são utilizados medicinalmente para tratar queimaduras, dores no peito, epilepsia, febre, dores de cabeça durante a menstruação e no parto (HARDWICK et al., 2013; GUPTA et al., 2016). Além disso, este vegetal possui altos teores de ácido fólico e vitamina B, que são necessários durante a gestação das mulheres para prevenir defeitos na calota craniana, bem como na coluna vertebral do feto (OGUNMODEDE e OYENUGA, 1970).

Panzeri et al. (2020) relatam que *V. unguiculata* apresenta atividade no combate ao câncer colorretal (CCR). Ao analisar o extrato de sementes de feijão-caupi, foi observado a redução da viabilidade celular nas linhagens de CCR, como E705, DiFi e SW480, sem danos a linhagem normal, livre de câncer CCD841. Além disso, os extratos mostraram a capacidade de reduzir o nível de fosforilação do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) nas linhagens celulares E705, DiFi e SW480 e diminuir a EC₅₀ (curva de dose-resposta graduada representa a concentração para qual 50% da população exibe uma resposta, após uma duração de exposição especificada) de um medicamento comum.

Recentemente, foi investigado o efeito protetor do extrato da semente do feijão-caupi contra o envelhecimento e neurodegeneração. Tripodi et al. (2020) relataram que o extrato aquoso de *V. unguiculata* retarda a senescência em *Saccharomyces cerevisiae* quanto em *Drosophila melanogaster*, onde foi observado um aumento da expressão dos genes *FOXO*, *SIRT1*, *NOTCH* e *Heme Oxygenase* (HO), já conhecidos por serem necessários para a extensão da longevidade em *D. melanogaster*. Os trabalhos abordados acima reforçam a importância no desenvolvimento de estudos que explorem o potencial biotecnológico de *V. unguiculata*.

3.6 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E MECANISMOS DE AÇÃO DOS AMPS

Grande parte dos organismos vivos são constantemente expostos a patógenos potencialmente prejudiciais, seja por inalação, contato ou ingestão desses microrganismos (HULTMARK, 2003). A sobrevivência desses organismos depende de uma rede de mecanismos de defesa, que por sua vez envolvem vários componentes (BALS, 2000). Por exemplo, a síntese de imunoglobulinas direcionadas contra microrganismos específicos é o mais sofisticado dos mecanismos de defesa conhecidos, sendo uma característica dos animais vertebrados (JUSTIZ et al., 2021; Carrillo et al. 2021).

A resistência antimicrobiana a drogas pode ser caracterizada pela capacidade dos microrganismos de resistir aos efeitos de um agente quimioterápico em que ele é geralmente susceptível (MADIGAN, 2016). A resistência pode ser uma característica natural de algumas espécies de microrganismos, como foi demonstrado já nos primeiros tratamentos químicos com o uso de antibióticos (LERMINIAUX et al. 2019). Dessa forma, a resistência natural pode está relacionada a genes de resistência que fazem parte do código genético do microrganismo. Por outro lado, a resistência adquirida não está normalmente relacionada a genes que compõem o código genético (HUTCHINGS et al. 2019). A resistência pode ocorrer pela aquisição de genes resistentes, por recombinação de DNA exógeno no cromossomo da bactéria ou, ainda, por mutação (Lerminiaux et al. 2019). A resistência originária da mutação genética pelo próprio microrganismo é conferida por meio de alterações na sequência dos nucleotídeos do código genético, resultando em síntese de proteínas diferentes das originais (EMA, 1999). Estas proteínas diferentes podem ser capazes de interferir na ação do medicamento, tornando-o ineficaz.

Muitos esforços têm sido realizados no sentido de se elucidar quais mecanismos de resistência são utilizados pelas plantas para se defenderem ou para evitarem o ataque por parte de seus agressores (HARBONE, 1982; CORNELISSEN e MELCHERS, 1993; PAPAGIANNI, 2003; HANCOCK, 2005; STRAUS e HANCOCK, 2006i). Vários autores relataram que a ação dos AMPS ocorre, em geral, por alteração da permeabilidade das membranas biológicas, como já mencionado (LIANG e KIM, 1999; PAPAGIANNI, 2003; HANCOCK, 2003).

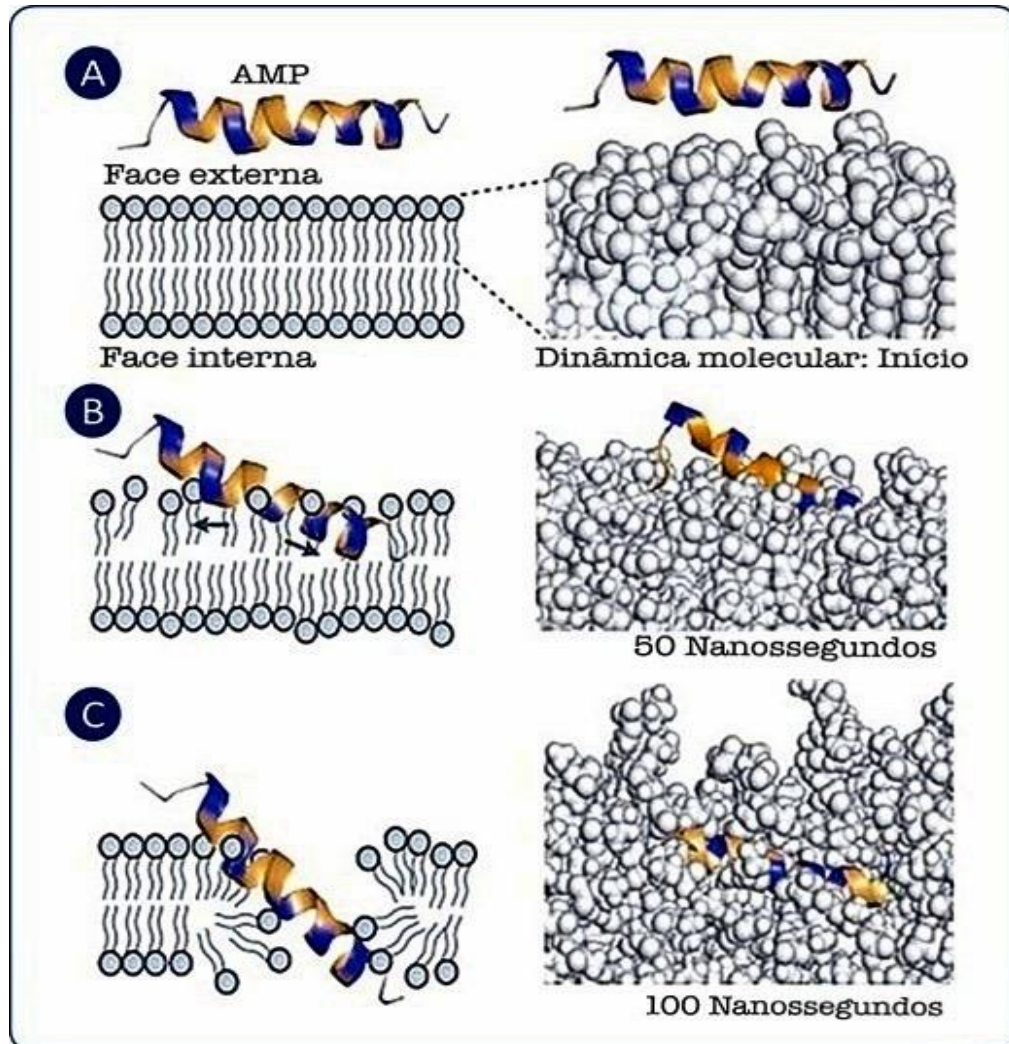
Essa interação pode causar a morte de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas e está ligada à formação de canais na membrana citoplasmática (LIANG e

KIM, 1999; BECHINGER et al., 2017), tendo a integridade da membrana destruída, a célula morre (LIANG e KIM, 1999; ZASLOFF, 2002). Diferentes modelos têm sido propostos para explicar a formação de canais na membrana provocada pelos AMPs (WU et al., 1999; HANCOCK, 1999). A forma de cada modelo depende do peptídeo (BUFFY et al. 2004; PORCELLI et al. 2004), como também das propriedades dos lipídios da parede celular do patógeno, ou seja, da fluidez, hidrofobicidade, carga líquida de membrana, bem como o comprimento da cadeia (PEDRO-BOTET et al. 2019; DOLEZELOVA et al. 2019).

Muitos AMPs podem interagir com os fosfolipídeos da monocamada lipídica externa dos microrganismos e podem formar canais, lisar as células ou até mesmo penetrar na célula para efetuar sua ação (ZASLOFF, 2002; BECHINGER et al. 2017). É importante destacar que a interação entre o peptídeo bioativo e a membrana do patógeno é um importante passo na ocorrência de muitos processos celulares (PAPO, 2003). Os fatores determinantes dos mecanismos antimicrobianos dos peptídeos estão relacionados às características dos envoltórios das células microbianas e à sua natureza físico-química. Acredita-se ainda que a atividade antimicrobiana e a seletividade dos AMPs sejam determinadas pelo modo de interação dessas moléculas com as membranas celulares dos microrganismos (TORNESELLO et al. 2020).

Outro modo de ação dos peptídeos antimicrobianos está relacionado à translocação da membrana e à interação com alvos no citoplasma. Normalmente, essas moléculas são carregadas positivamente e realizam interações com as cabeças lipídicas carregadas negativamente na superfície da membrana plasmática da célula microbiana (Figura 1). Assim, esses peptídeos podem inserir-se na bicamada em direções paralelas ou perpendiculares, levando a desorganização do arranjo lipídico. Fjell et al. (2012) propuseram em seu trabalho que esse distúrbio na estrutura do envoltório celular, incluindo adelgaçamento, formação de poros, mudanças de curvatura, mudanças eletrostáticas e interferência local, são decorrentes das interações de peptídeos antimicrobianos. Foi observado também a translocação de AMPs e sua difusão no citoplasma, atuando na síntese de DNA, controle da expressão gênica, estabilidade e endereçamento de proteínas (FJELL et al. 2012; ODINTSOVA et al. 2020).

Figura 1 – Formas de interação de AMP com a membrana plasmática. O AMP está representado como um espiral, os resíduos com carga positiva estão representados em azul e os resíduos restantes são representados em amarelo. A – Estágios iniciais de ação incluem o ataque à membrana plasmática. B – Inserção na superfície da membrana. C- Peptídeos de pequeno tamanho permeiam a membrana plasmática.



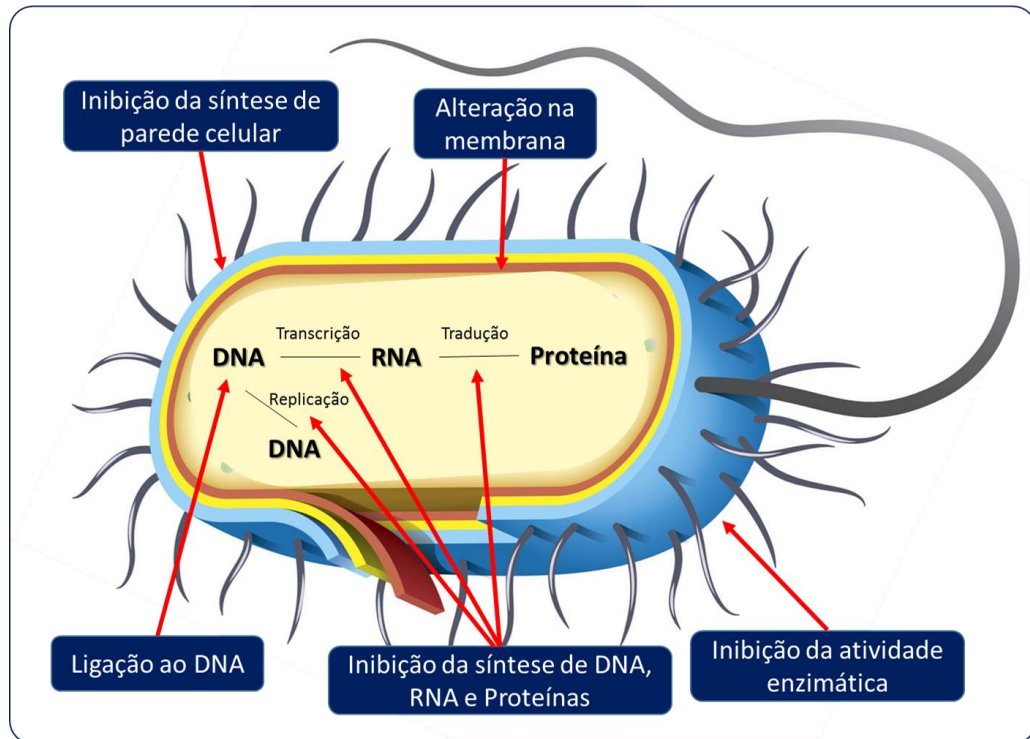
Fonte: Adaptado de Fjell et al. (2012).

Uma vez ligados à membrana, isso poderá favorecer a formação de estruturas secundária, com base em sua hidrofobicidade. Como no caso da maioria dos peptídeos α -helicoidais e β -hairpin, que apresentam um nível relativamente constante de hidrofobicidade ao longo de seu eixo, o que os força a se orientarem para a membrana de modo paralelo ou perpendicular (DIAMOND et al. 2009).

Brogden (2005) destacou que, além de atacar a camada lipídica dos patógenos, existem outros mecanismos de ação dos Peptídeos que não estão relacionados à lise celular, pois muitos AMPs também atuam em alvos intracelulares. Tais AMPs "intracelulares" podem agir inibindo a síntese da parede celular, alterando

a membrana plasmática da célula, ativando a autolisina, ligando-se ao DNA, inibindo a síntese de DNA, RNA ou proteínas, ou ainda através da perda da atividade enzimática (Figura 2).

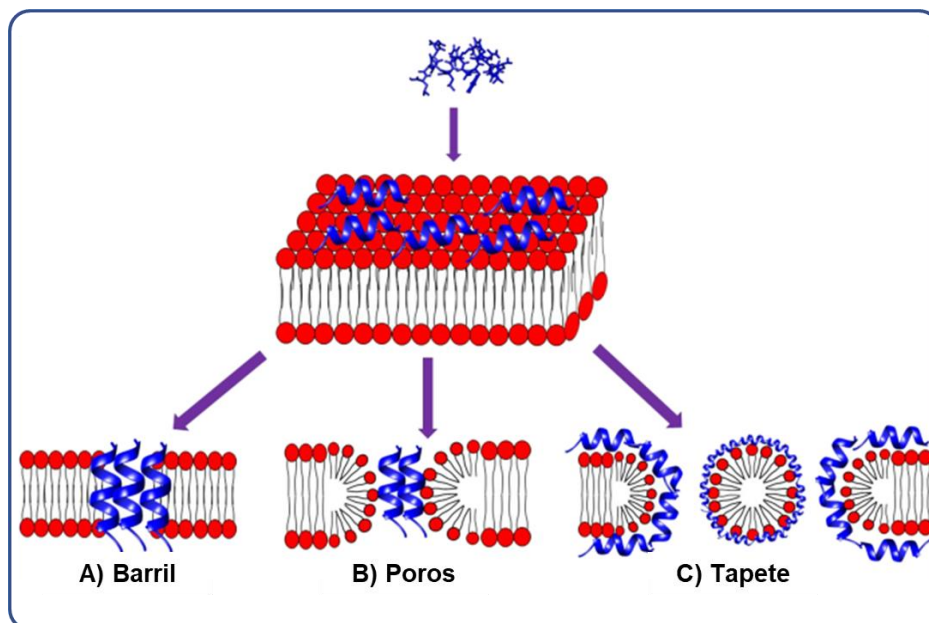
Figura 2 – Possíveis alvos intracelulares que peptídeos antimicrobianos podem atuar.



Fonte: Proprio autor, (2022).

As magaininas, cecropinas e o mexican figuram entre os AMPs mais estudados quanto aos mecanismos de ação, pois além de possuírem estrutura de α -hélice esses peptídeos apresentam relação entre sua atividade e estrutura secundária (SEO et al. 2012). Vários mecanismos de ação são propostos, como estrutura de barril (*barrel-stave model*), estrutura de tapete (*carpet model*) e formação de poros (*Toroidal pore model*) (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismos de ação dos AMPs. A) Modelo de barril; B) Poro toroidal e C) Modelo de tapete.



Fonte: Modificado de Manniello et al. (2021).

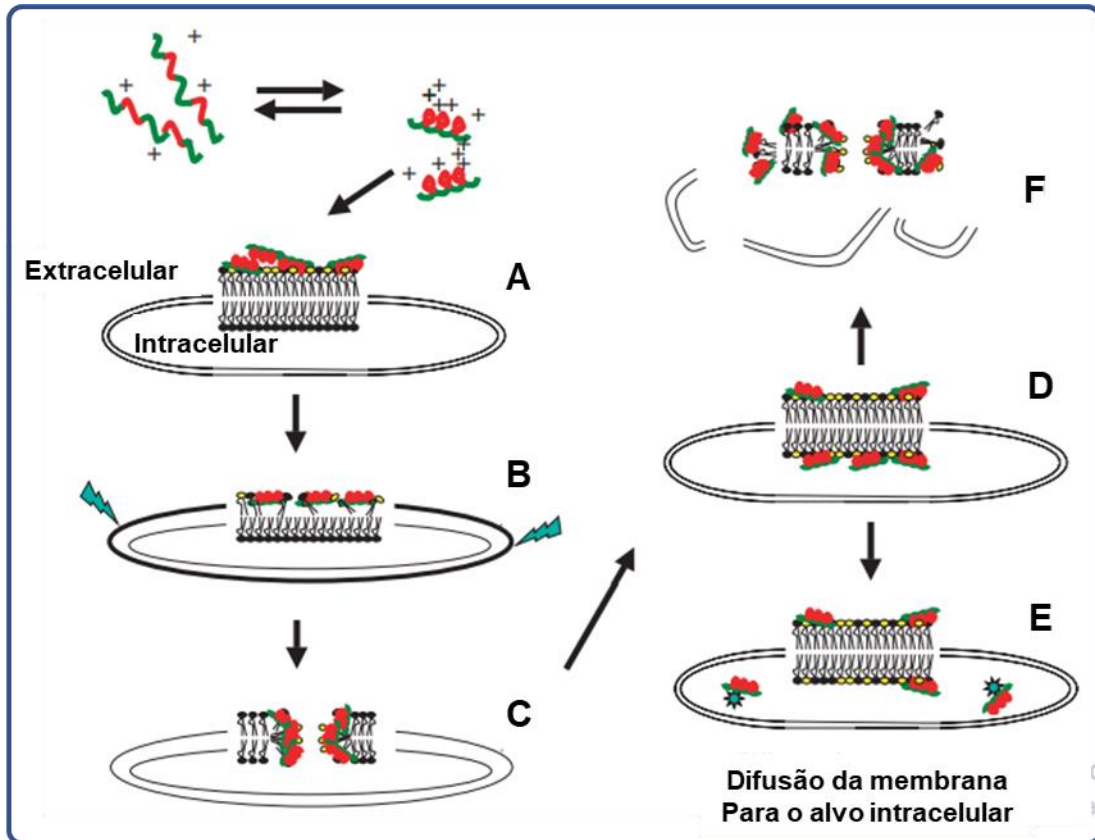
Alguns modelos de mecanismos de ação foram propostos, tendo como base interações iniciais (eletrostática e hidrofóbica) entre os peptídeos e a membrana celular (CARVALHO e MACHINI, 2013; DA COSTA et al. 2015). Para o mecanismo de estrutura em barril, momentos antes da ligação dos AMPs à superfície da membrana bacteriana, sua estrutura secundária sofre uma mudança conformacional, que possibilita a ocorrência de uma cascata de agregação das unidades monoméricas de forma paralela à face hidrofóbica que fica orientada em direção ao núcleo hidrofóbico da membrana enquanto a face hidrofílica fica orientada na direção das regiões aquosas da membrana formando um poro em “barril” (SALDITT et al. 2006; da COSTA et al. 2015; ANDERSSON et al. 2016).

No modelo estrutura de tapete, os peptídeos se acumulam na membrana, causando uma desorganização dos lipídeos que acarreta uma quebra de ligações e permite que estes penetrem para o interior da membrana, levando a sua desestabilização com formação de micelas (SALDITT et al. 2006; LEE et al. 2015; LE et al. 2017).

Existe ainda um modelo que prevê efeitos dos AMPs sobre alvos intracelulares, sendo esse modelo conhecido como *Shai-Matsuzaki-Huang* (Figura 4). Seguindo esse modelo, teremos a formação de poros transitórios por onde os peptídeos

difundem-se no citoplasma, possivelmente atingindo alvos intracelulares (ZASLOFF, 2002).

Figura 4 - Esquema do modo de ação dos peptídeos antimicrobianos referente ao modelo de Shai-Matsuzaki-Huang.



Fonte: Zasloff, (2002). *Em (A) formação de tapete peptídico, (B) redução da espessura da camada externa da membrana celular, (C) formação de poros, (D) transporte de lipídios e peptídeos, (E) difusão de peptídeos para alvos intracelulares e em (F) lise da membrana celular.

Na figura 4-A é observada a formação de um tapete de peptídeos na camada externa da membrana. Posteriormente, ocorre a integração do peptídeo à membrana e afinamento da camada externa (Figura 4-B) e a formação de poros transitórios (Figura 4-C). Na Figura 4-D observa-se o transporte de lipídios e peptídeos para a camada interna, seguido da difusão dos peptídeos para alvos intracelulares (em alguns casos) (Figura 4-E). Por fim, ocorrerá o colapso da membrana em fragmentos e ruptura física da membrana da célula alvo (Figura 4-F) (LUCCHESI, 2019).

3.7 DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS

O desenho racional de peptídeos representa uma abordagem moderna para o desenvolvimento de moléculas com potencial uso clínico. Essa abordagem metodológica tem sido utilizada a fim de reduzir ou eliminar os efeitos adversos, de acordo com o princípio da toxicidade seletiva, uma vez que o principal obstáculo à utilização de peptídeos reside na sua toxicidade para células de mamíferos. Isto não é surpreendente, pois a atividade dos peptídeos depende significativamente da interação membrana-peptídeo (FJELL et al. 2012; SUN et al. 2018).

Os primeiros estudos que utilizaram o desenho racional de AMPs geraram vários análogos de peptídeos conhecidos, tais como as catelicidinas, defensinas, magaininas e cecropinas. Porém, a maioria dos análogos gerados foram menos ativos que o protótipo original. Mesmo assim, estes estudos desempenharam um papel importante na identificação das propriedades físico-químicas envolvidas na atividade antibacteriana dos peptídeos. Estas propriedades foram a base para o desenvolvimento de abordagens para previsão da atividade antibacteriana, através de vários métodos, como: *support vector machine* (SVM) (LATA, 2007), redes neurais artificiais (RNAs) (FJELL, 2009) e relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica ou até mesmo alguma propriedade físico-química (QSAR/QSPR) (JENSSEN, 2007; MANT et al. 2019).

A atual disponibilidade de informações sobre a relação estrutura e função de diversos AMPs nas bases de dados públicas tem permitido o uso destes como templates (desenho baseado em molde) para o desenvolvimento de peptídeos otimizados (CARDOSO et al. 2018; PORTO et al. 2017; SUN et al. 2018). Isto pode promover a alteração das características dos peptídeos que estão diretamente relacionadas com suas atividades antimicrobianas, como a carga, hidrofobicidade e arranjo estrutural anfipático (CARDOSO et al. 2016; PORTO et al. 2012). Ademais, estratégias de desenho pela substituição de resíduos também têm permitido a identificação da importância de aminoácidos específicos e sua posição para uma determinada atividade do peptídeo molde/modificado (FJELL et al. 2012; HUANG et al. 2010; PAG et al. 2008). Além disso, a substituição de resíduos naturais por resíduos modificados, como D-aminoácidos, tem sido realizada objetivando uma menor susceptibilidade à degradação proteolítica (CHEN et al. 2005; HUANG et al. 2010).

Dentro da ideia de modificação e adição de resíduos de aminoácidos em AMPs, podemos citar a modificação incremental de sequências peptídicas com resíduos hidrofóbicos. Deste modo, a adição de *end-tags* constituídas de resíduos apolares (triptofano, fenilalanina, lisina, isoleucina e prolina) às porções N- ou C- terminal da sequência de alguns tem promovido o melhoramento do potencial antimicrobiano e atividade imunomodulatória destas moléculas (PASUPULETI et al. 2009; SCHMIDTCHEN et al. 2009; SILVA et al. 2016).

Também pode ser abordada a fusão de fragmentos, uma estratégia de desenho racional para a obtenção de quimeras (ou híbridos) que possuem características favoráveis de ambos os peptídeos parentais (FJELL et al. 2012; MARCOS et al. 2008; SUN et al. 2018). Por exemplo, Andreu et al. (1992) desenharam peptídeos quiméricos de cecropina A e melitina com potencial antimicrobiano melhorado e com maior espectro de ação em relação à cecropina A, sem apresentar ainda os efeitos citotóxicos da melitina. Estas quimeras também foram desenhadas visando a redução do tamanho das sequências parentais, com o objetivo de otimizar sua síntese química. Memariani et al. (2016) desenharam um peptídeo quimérico curto, denominado PV3, a partir de resíduos da região N-terminal do peptídeo pEM-2 derivado da peçonha da serpente *Bothrops asper* e resíduos da região C-terminal do peptídeo isolado de *Vespa tropica*, mastoparano-VT-1. Este AMP apresentou atividade antibacteriana frente a cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, sendo também ativo na redução da biomassa do biofilme desta bactéria.

Em contraste aos métodos baseados em template, os métodos de *novo* não utilizam moldes para criação de análogos peptídicos. O desenho *de novo* permite gerar uma grande variedade de sequências peptídicas usando apenas frequências ou padrões de aminoácidos e preferências de posicionamento (PORTO et al. 2012). Estes padrões podem ser gerados, por exemplo, através do alinhamento de porções de diversas sequências peptídicas, como realizado por Tossi et al. (1997). No trabalho destes autores, foram levados em consideração parâmetros como o tamanho, cationicidade, propensão de α -hélice e conformação anfipática de sequências candidatas para o desenvolvimento de padrões, os quais poderiam ser aplicados para o desenho de AMPs. Neste mesmo sentido, o modelo linguístico desenvolvido por Loose et al. (2006) representa uma estratégia adicional para esta metodologia. No entanto, diferentemente do método desenvolvido por Tossi et al. (1997), no modelo linguístico, os AMPs são modelados com base em uma linguagem formal que utiliza

“Padrões textuais” (determinados padrões) e um vocabulário formado por aminoácidos representados por letras (por exemplo, lisina (K) e arginina (R)) (LOOSE et al. 2006).

Em adição aos métodos já descritos, o desenvolvimento de algoritmos para a predição da estrutura e função de peptídeos constitui uma estratégia somática para o desenho computacional de peptídeos antimicrobianos. Dentre estes, podemos citar os algoritmos de aprendizado de máquina (*machine learning*), os quais estão baseados em inteligência artificial e que são treinados com diferentes preditores, incluindo propriedades físico-químicas e estruturais (CARDOSO 2019; KOTSIANTIS 2007; PORTO et al. 2017). Deste modo, os métodos de previsão e planejamento racional desempenham um papel crucial na melhoria da atividade dos AMPs frente às 'superbactérias'. (SUN et al. 2018).

3.8 PEPTÍDEOS E SUAS APLICAÇÕES

Os AMPs apresentam potencial considerável para uma variedade de aplicações terapêuticas para favorecer diferentes organismos (AUMELAS et al. 1996). Com a descoberta das diferentes classes estruturais de peptídeos antimicrobianos, em diversas classes de organismos, cresce o otimismo de que alguns destes compostos possam ser empregados em terapias de humanos (GANZ e LEHRER, 1999; MARR et al, 2006; GUANÍ-GUERRA et al. 2010). Do ponto de vista da sua aplicação clínica, atualmente alguns peptídeos antimicrobianos já são reconhecidos como fármacos eficazes e, portanto, empregados rotineiramente na clínica médica. Dentre estes, pode-se mencionar a bacitracina, colistina, polimixina B, daptomicina, vancomicina e gramicidina, oriundos de diferentes organismos e utilizados no tratamento contra agentes infecciosos (ROSCIA et al. 2013; HARRISON et al. 2014; BECHINGER; GORR, 2017).

Desde a descoberta dos peptídeos, os pesquisadores estão esperançosos que estas moléculas possam ajudar a resolver o problema de bactérias que se tornaram resistentes a antibióticos comuns. Muitas dessas drogas usadas atualmente possibilitam essa resistência porque eles executam sua função em uma porção muito específica dos patógenos. Como resultado, mudanças minuciosas no alvo são suficientes para impedir o fármaco de ser eficaz (CHAN, 2006). Por exemplo, uma mutação em um aminoácido na subunidade ribossomal 12S de *Mycobacterium*

tuberculose resulta na resistência contra estreptomicina (FINKEN et al. 1993). Portanto, nunca foi tão crucial como agora descobrir novos agentes antimicrobianos. Os AMPs apresentam-se como bons candidatos para reverter essas tendências (CHAN et al. 2006; BECHINGER; GORR, 2017).

Considerando-se que AMPs foram usados na natureza por milhões de anos e ainda são altamente efetivos atualmente, eles são muito promissores. Embora já tenham sido descritos aqui alguns mecanismos de resistência aos AMPs, como os mencionados em tópicos anteriores, eles envolvem mudanças principalmente na composição da membrana para alterar a carga e então interferir na associação do peptídeo com a membrana celular (BROGDEN, 2005). Diversos estudos tem mostrado que peptídeos antimicrobianos podem atuar em sinergismo com os antibióticos atualmente utilizados podendo atuar contra bactérias multirresistentes, melhorando a potência dos antibióticos (GIACOMETTI et al. 2005). Consequentemente, essas moléculas são de grande interesse como uma nova classe de agentes antimicrobianos.

4 PEPTÍDEOS BIOINSPIRADOS EM *THAUMATIN-LIKE PROTEIN* DE *Vigna unguiculata*: DESENHO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE

Wilson Dias de Oliveira¹; Livia Maria Batista Vilela¹; Carlos André dos Santos Silva²; Palloma Lima de Oliveira¹; Caroline de Jesús Pires¹; Kyria Cilene de Andrade Bortoleti³; Ana Christina Brasileiro Vidal¹ & Ana Maria Benko-Iseppon¹

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Recife, PE – Brasil.

²IRCCS materno infantile Burlo Garofolo, Trieste – Itália.

³Universidade Federal do Vale São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, PE – Brasil.

Resumo

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) vêm atraindo muita atenção devido aos seus potenciais usos na saúde e na agricultura. Suas aplicações biotecnológicas podem envolver a molécula nativa ou AMPs modificados, visando otimizar sua eficiência e diminuir sua toxicidade. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver peptídeos antimicrobianos bioinspirados em *Thaumatin-Like Proteins* (TLPs) identificadas no feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada nos preditores dos bancos CAMPr₃, MLAMP e ADAM, enquanto a toxicidade foi avaliada no Toxipred. A avaliação da atividade específica contra cepas bacterianas foi realizada no DBAASP_{3.0}. O desenho racional foi conduzido com objetivo de manter a atividade antimicrobiana e minimizar a toxicidade. A modelagem tridimensional foi realizada por *threading* e a estabilidade dos modelos avaliada pela simulação em dinâmica molecular. Todos os modelos apresentaram atividade antimicrobiana *in silico*, com destaque para o modelo PVuTLP1 que apresentou melhores previsões em comparação aos outros peptídeos. Foram realizados ensaios antimicrobianos *in vitro* contra cepas bacterianas, bem como potencial citotóxico e genotóxico, avaliados através do ensaio de MTT e teste do micronúcleo com a linhagem celular L929. Os resultados das análises *in vitro*, revelaram que quatro peptídeos desenvolvidos possuem atividade inibitória contra outros patógenos testados, com destaque para PVuTLP1, que inibiu o crescimento de todas as cepas, sendo a concentração mínima inibitória (MIC) contra *Acinetobacter baumannii* de 32 µg/mL, seguido do PVuTLP4, com atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Acinetobacter baumannii* MIC a 512 µg/mL. PVuTLP1 não causou interferência na viabilidade celular e livre de danos ao DNA das células analisadas, não apresentando toxicidade significativa nas concentrações testadas. Portanto, o presente estudo desenvolveu novos peptídeos antimicrobianos com atividade contra alguns patógenos de interesse para a saúde pública, devendo passar por estudos pré-clínicos adicionais com vistas à geração de um potencial fármaco antimicrobiano.

Palavras-chave: AMP; Citotoxicidade; Genotoxicidade; Micronúcleo; TLP.

Introdução

O uso indiscriminado de fármacos nos últimos 60 anos tem contribuído para o aumento de microrganismos resistentes ^[1], gerando um problema de saúde pública, uma vez que o número de cepas patogênicas multiresistentes tem aumentado, dificultando os tratamentos com os antibióticos tradicionalmente utilizados ^[2].

Buscando solucionar esse problema, a busca por novos compostos antimicrobianos tem aumentado nos últimos anos ^[3,4,5]. Estudos realizados com peptídeos antimicrobianos, também conhecidos como AMPs, que são naturalmente produzidos por bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados, podem oferecer uma nova alternativa de tratamento ^[6,7].

Os AMPs constituem uma classe de compostos antimicrobianos que atua como primeira linha de defesa do sistema imune ^[8]. Eles têm sido estudados, não só com aplicação direta contra patógenos, mas também em combinação com antibióticos de uso clássico como vancomicina e ampicilina ^[9,10]. Por outro lado, algumas famílias de proteínas vegetais, também exibem atividade antimicrobiana. Entre as proteínas que apresentam relação com a resposta imune do vegetal e que participam dos mecanismos de defesa contra patógenos, pode-se destacar as *Thaumatococcus*-Like ou TLPs (*Thaumatococcus*-Like Proteins) que pertencem à superfamília *Pathogenesis-Related* (PR) 5.

Considerando as funções biológicas potenciais, a maioria das TLPs apresenta atividade antifúngica, atuando contra fungos invasores através de suas atividades de ligação ou por hidrólise de β -1,3-glucanas ou, ainda, pela inibição de enzimas, como as xilanases ^[11,12,13,14]. Embora as TLPs apresentem ação antifúngica, alguns estudos apontam seu papel na resposta à invasão por outros microrganismos como bactérias, vírus ou protozoários ^[15,16]. Devido às suas funções biológicas, as TLPs se apresentam como proteínas promissoras para o processo de desenvolvimentos de novos peptídeos antimicrobianos com potencial uso terapêutico, por estarem presentes no processo de resistência de plantas contra o ataque de patógenos ^[13].

Nos últimos anos, o surgimento de microrganismos resistentes às drogas convencionais, tem proporcionado uma busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento clínico ^[17]. Dentre as estratégias para a obtenção de ativos potencialmente promissores, destaca-se o desenho racional de AMPs, que busca otimizar a atividade biológica e reduzir a toxicidade desses candidatos ^[6]. Naturalmente, há peptídeos que apresentam elevado nível de toxicidade, mesmo após as estratégias de modificação para minimizar tal efeito. Por isso, é importante a realização de ensaios *in vitro* que venham avaliar potencial toxicológico dessas moléculas desenvolvidas, podendo ser empregado o ensaio de MTT (brometo de 3,4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) para análise da viabilidade celular e o ensaio de Micronúcleo, com intuito de verificar os danos causados a nível de DNA ^[18,19].

Diante deste cenário, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar peptídeos bioinspirados em PVuTLPs identificadas, bem como fornecer conhecimentos sobre suas principais características funcionais e toxicidade.

Materiais e Métodos

Obtenção de PVuTLPs

As sequências foram obtidas do banco de dados GpGC: *Cowpea Genomics Consortium*, depositadas por Jesus-Pires et al. (2020). O domínio conservado de todos os TLPs de feijão-caupi foi localizado usando a ferramenta (Batch CD-Search), sendo as sequências selecionadas para uso nas análises posteriores [20].

Desenho racional, predição de atividade antimicrobiana e toxicidade

O desenho racional dos peptídeos foi realizado levando em consideração o tamanho da sequência-alvo (20-30 aa), predição da atividade antimicrobiana e predição de não toxicidade. A atividade antimicrobiana foi predita através dos servidores CAMP_{R3} [21], MLAMP e ADAM considerando os algoritmos *Support Vector Machine* (SVM) e os preditores iAMP-2L e DBAASP_{3.0}, *Random Forest Classifier* (RFC), *Artificial Neural Network* (ANN) e *Discriminant Analysis Classifier* (DAC). Foram realizadas substituições de alguns aminoácidos para minimizar os efeitos tóxicos apontados na predição, com precaução em vista da manutenção da atividade antimicrobiana predita. Por fim, foi realizada uma análise de toxicidade *in silico* para cada peptídeo racionalmente modificado usando o servidor Toxinpred [22].

Modelagem Tridimensional 3D, Simulação em Dinâmica Molecular (DM) e Síntese química

Após a obtenção dos peptídeos racionalmente modificados, a sequência primária de cada modelo teórico foi submetida a uma modelagem 3D, utilizando o servidor I-Tasser a fim de analisar as características estruturais das moléculas reduzidas e racionalmente modificadas.

Para a simulação em dinâmica foi usado o pacote GROMACS 2019.4. Os modelos teóricos que foram obtidos na etapa anterior foram depositados no centro de uma caixa cúbica com 4 x 4 x 4 nm e solvatados usando o modelo de água do tipo SPC (*Simple Point Charge*) [23], substituindo as moléculas de soluto por íons Na⁺ e Cl⁻ na concentração de 0,15 M, seguido de minimização de energia. A temperatura utilizada foi 300 K sem átomos de soluto na posição inicial. O método LINCS [24] foi usado para restringir as ligações envolvendo átomos de hidrogênio. A integração foi realizada pelo algoritmo de salto [25] usando um passo de tempo de integração de 2-fs. Os sistemas foram inicialmente otimizados para energia usando 50.000 passos do algoritmo de descida mais íngreme. As simulações atomísticas foram realizadas para 100 ns usando os campos de força GROMOS 53A6 [26] e condições de contorno periódicas nas direções x, y e z. Por fim, a dinâmica molecular foi realizada sem restrições quanto à pressão e à temperatura constantes de 1 atm e 300 K.

Após as avaliações, peptídeos racionais foram selecionados considerando (i) atividade antimicrobiana predita; (ii) toxicidade predita; e (iii) estabilidade da molécula foram adquiridos comercialmente da *NovoPro Bioscience Inc.* (Shanghai, China).

Atividade antimicrobiana *in vitro*

A Concentração Inibitória Mínima (MIC) para os peptídeos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do *Institute of Clinical*

and Laboratory Standards – CLSI (CLSI, 2017), com modificações. Para isso, os PVuTLPs em Caldo Müller-Hinton (CA-MHB) (Sigma) foram adicionados à placa sob diluição em série (50 µL). As cepas bacterianas foram cultivadas em Müller Hinton (Himedia) com 1 mL de CA-MHB durante a noite a 37 °C e foi determinado pela densidade de oxigênio dissolvido (OD_{625nm} de 0,08-0,13 AU) correspondendo a 0,5 da escala de McFarland ($1-5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). A solução foi diluída (1:1000) em CA-MHB e inoculada na placa de 96 poços (50 µL) onde a concentração final de células bacterianas foi de aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC/mL. O MIC foi determinado como a concentração mais baixa de peptídeo que inibiu o crescimento bacteriano após a incubação a 37 °C por 18 a 20 h. O meio CA-MHB não inoculado foi usado como controle negativo e culturas sem adição de peptídeo serviram como controle positivo. As cepas bacterianas usadas no experimento foram cedidas pelo laboratório de microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz/PE). Os peptídeos foram testados contra cepas Gram-positivas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Os experimentos foram realizados em triplicatas em diferentes intervalos de tempo.

Citotoxicidade pelo ensaio do MTT

O ensaio de MTT foi realizado utilizando a linhagem celular L929, oriundas de fibroblastos de camundongo, cedidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). As células foram descongeladas e mantidas em meio de cultura DMEM, suplementados com Soro Bovino Fetal (10%), antibiótico/ antimicótico (penicilina/ estreptomicina), a 37 °C com 5% de CO₂.

O teste de MTT seguiu o protocolo de Mosmann (1983), com algumas modificações. As concentrações foram baseadas no melhor desempenho de seu potencial antimicrobiano. Células L929 (2×10^4 células/poço) foram semeadas em placas com 96 poços, com meio DMEM (100 µL/poço) e incubados por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Em seguida, os peptídeos foram diluídos em meio DMEM, utilizando as concentrações de 64, 128, 256, 512 e 1.014 µg/mL de todos os peptídeos. Foram adicionados 100 µL na placa de 96 poços, bem como o meio de cultura DMEM (controle negativo) e Triton X-100 1% (controle positivo), e incubadas à 37 °C com 5 % de CO₂ por 24 h. Após o tempo de exposição, 20 µL da solução de MTT (5 mg/mL) (Nº CAS 298-931, Sigma) foram adicionados em todos os poços e incubados por 3 h. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, sendo os cristais de formazan dissolvidos com 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). A leitura das absorbâncias foi realizada a 570 nm.

Teste do micronúcleo por bloqueio de citocinese

As células L929 ($0,1 \times 10^6$ células/poço) foram semeadas em placas de 12 poços, contendo meio DMEM e incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas com o peptídeo PVuTLP1 nas concentrações 64, 128 e 256 µg/ml; Metanossulfonato de metila 4×10^{-4} M (MMS; Controle Positivo, CP) e apenas meio (Controle Negativo, CN). Após 24 h, 3 µg/mL de citocalasina B foram adicionados. Após 24 h de incubação, as células foram fixadas em Carnoy (metanol: ácido acético; 9:1) e coradas com DAPI. O experimento foi realizado em triplicata. Cada unidade experimental foi composta por três repetições técnicas (n = 3). Cada réplica técnica consistiu em 3000 células binucleadas/lâmina,

totalizando 3000 células/repetição técnica e 9000 células/tratamento. As frequências de micronúcleos (MN), brotos nucleares (NB) e pontes nucleoplasmáticas (NPB) foram quantificadas. Adicionalmente, foi calculado o índice de citotoxicidade por divisão celular (NCDI) foram calculados com 500 células de acordo com a fórmula $NCDI = [M1 + 2M2 + 3 (M3 + M4)] / N$ (onde N é o número total de células analisadas, M1-M4 referem-se ao número de células com um a quatro núcleos).

Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Para a viabilidade celular, micronúcleo e NCDI foi utilizado o software Statistica 8.0 ($p < 0,05$), a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, enquanto a homogeneidade foi testada por ANOVA e teste de Levene's. Após esta análise, foram comparados pelos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis.

Resultados e Discussão

Desenho racional e predição de atividade antimicrobiana e toxicidade

Foram desenhados racionalmente quatro modelos bioinspirados em TLPs, os quais foram nomeados PVuTLPs, considerando-se tipo e origem, como peptídeos derivados de *Thaumatin-like Protein* (TLP) de *Vigna unguiculada* (Vu). Todos os modelos teóricos foram classificados como peptídeo antimicrobiano (AMP) em no mínimo três dos quatro preditores utilizados (Tabela 2).

Tabela 2: Predição de classificação dos modelos usando o algoritmo *Artificial Neural Network* (ANN) dos preditores on-line CAMP_{R3}, iAMP-2L, DBAASP_{3.0} e ADAM.

Peptídeos	Preditores			
	CAMP _{R3}	iAMP-2L	DBAASP _{3.0}	ADAM
PVuTLP1	AMP	AMP	Non-AMP	AMP
PVuTLP2	AMP	AMP	AMP	AMP
PVuTLP3	AMP	Non-AMP	AMP	AMP
PVuTLP4	AMP	AMP	Non-AMP	AMP

*AMP: Antimicrobial peptides

Todas as pontuações obtidas para a predição da atividade antimicrobiana, foram superiores a 50% nos três algoritmos analisados (Tabela 2). Além disso, todos os modelos teóricos não apresentaram toxicidade celular significativa *in silico* (Tabela 3).

Tabela 3: Predição de atividade antimicrobiana usando os quatro algoritmos do preditor CAMP_{R3} e o ToxinPred para toxicidade. *Support Vector Machine* (SVM), *Random Forest Classifier* (RFC) e *Discriminant Analysis Classifier* (DAC).

Peptídeos	SVM	RFC	DAC	Toxicidade
PVuTLP1	0.63	0.90	0.88	Não toxico
PVuTLP2	0.63	0.68	0.90	Não toxico
PVuTLP3	0.66	0.83	0.82	Não toxico
PVuTLP4	0.76	0.64	0.98	Não toxico

As valores dos quatro modelos teóricos estão dentro da margem de segurança considerada eficiente quanto a apresentação de atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo*, visto que é de comum acordo na literatura que atividades antimicrobianas superiores à 70% devem ser consideradas [27,28].

Nas análises de predição de atividade inibitória contra microrganismo específico, PVuTLP1 exibiu ação antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Enquanto PVuTLP2, PVuTLP3 e PVuTLP4 apresentaram atividade contra *Klebsiella pneumoniae*. Em paralelo, nenhum dos modelos teóricos demonstrou atividade para eritrócitos humanos, revelando o baixo nível de toxicidade predita para os peptídeos desenhados racionalmente (Tabela 4).

Tabela 4: Predição de atividade contra espécies microbianas usando o servidor DBAASP 3.0.

Peptídeos	Microrganismos e células testadas			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	Human erythrocytes	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
PVuTLP1	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
PVuTLP2	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
PVuTLP3	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
PVuTLP4	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

Modelagem 3D e Dinâmica molecular

A maioria dos modelos teóricos apresentou estruturas secundárias, tendo adquirido a formação de alfa hélice para PVuTLP1 e PVuTLP4, e de fitas betas para PVuTLP2. Por sua vez, PVuTLP3 não apresentou formação de estrutura secundária e assumiu uma formação em coil (Figura 5).

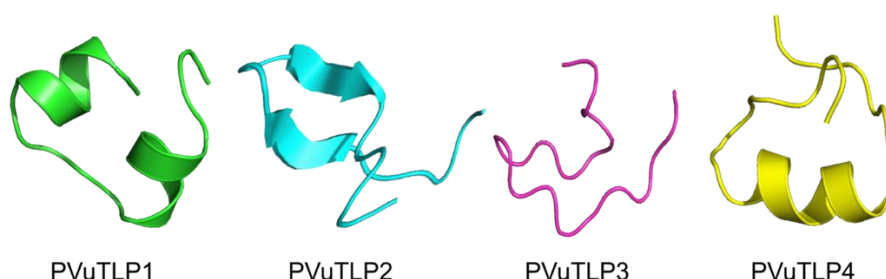


Figura 5: Modelagem tridimensional dos peptídeos realizada no I-Tasser.

Além disso, o potencial eletrostático de superfície para os quatro modelos (Figura 6), mostra a predominância de cargas catiônicas superficiais desses peptídeos, sugerindo configurações anfipáticas, com destaque o modelo PVuTLP1, que apresentou maior parte de sua superfície carregada positivamente (Figura 6).

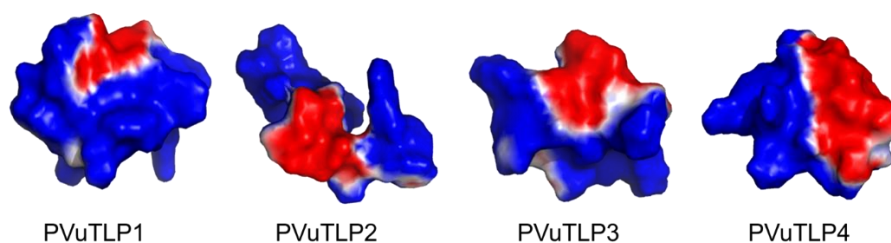


Figura 6: Potencial de superfície eletrostático dos modelos teórico tridimensional de PVuTLPs. Regiões catiônicas em azul e aniônicas em vermelho.

Com a finalidade de observar as possíveis modificações que os modelos poderiam sofrer, os gráficos de desvio da raiz quadrática média (RMSD) e flutuação da raiz quadrática média (RMSF) foram avaliados (Figura 7).

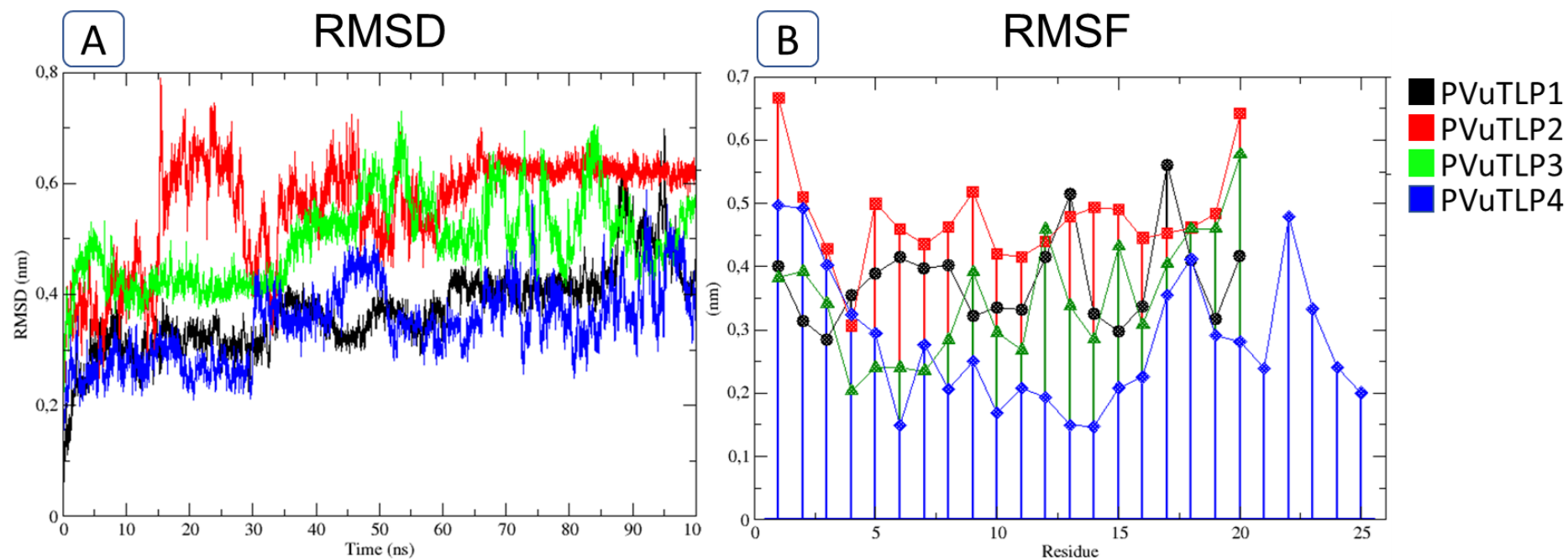


Figura 7: Representação dos quatro modelos teóricos após análises de DM. Em (A), o desvio da raiz quadrática média (RMSD). Em (B) a flutuação da raiz quadrática média (RMSF).

De modo geral, todos os modelos deixaram a conformação original (Figura 7.A), mas foram estáveis nos últimos 40 ns na maioria das simulações de dinâmica molecular (à exceção de PVuTLP4). Quanto à flutuação dos resíduos de aminoácidos analisada, oito picos flutuaram mais claramente, sendo quatro nas regiões terminais, com picos mais altos para PVuTLP2, assim como outros dois picos mais altos localizados entre os resíduos de aminoácidos 19-20 e 16-18 para os modelos PVuTLP3 e PVuTLP1, respectivamente (Figura 7.B).

A análise do *b-factor* mostrou que aquelas regiões com maiores vibrações (Figura 7.B) aponta que provavelmente os picos correspondem às regiões de extremidades dos modelos ou em regiões de *loops* com ausência de estrutura secundária, para as quais é esperado um maior grau de flexibilidade na avaliação da flutuação da raiz quadrática média (Figura 8).

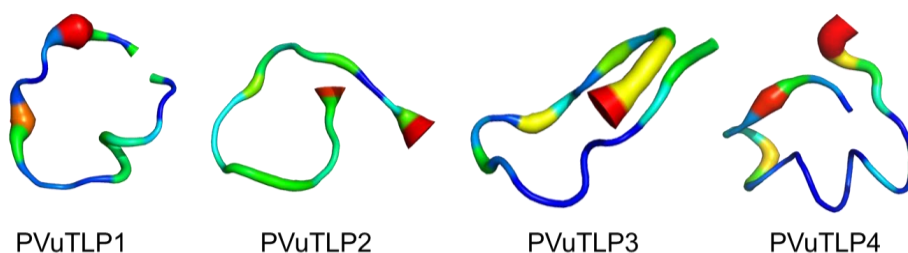


Figura 8: Representação dos quatro modelos teóricos após análises do *b-factor*. As cores quentes (Vermelho, laranja e amarelo) representam regiões de alta vibrações, enquanto as cores frias (Azul escuro, azul claro e verde) são regiões mais rígidas.

O raio de giro confirma que as estruturas permaneceram compactas, com destaque para PVuTLP1 e PVuTLP2, corroborando a hipótese de que as regiões com estrutura secundária mantêm as regiões estruturadas mais rígidas, enquanto PVuTLP3, que carece de estruturas secundárias, foi menos compacta. Este comportamento pode ser explicado pela ausência de estruturas secundárias nas regiões c-terminal, o que gera uma maior flexibilidade dessas regiões (Figura 9.A).

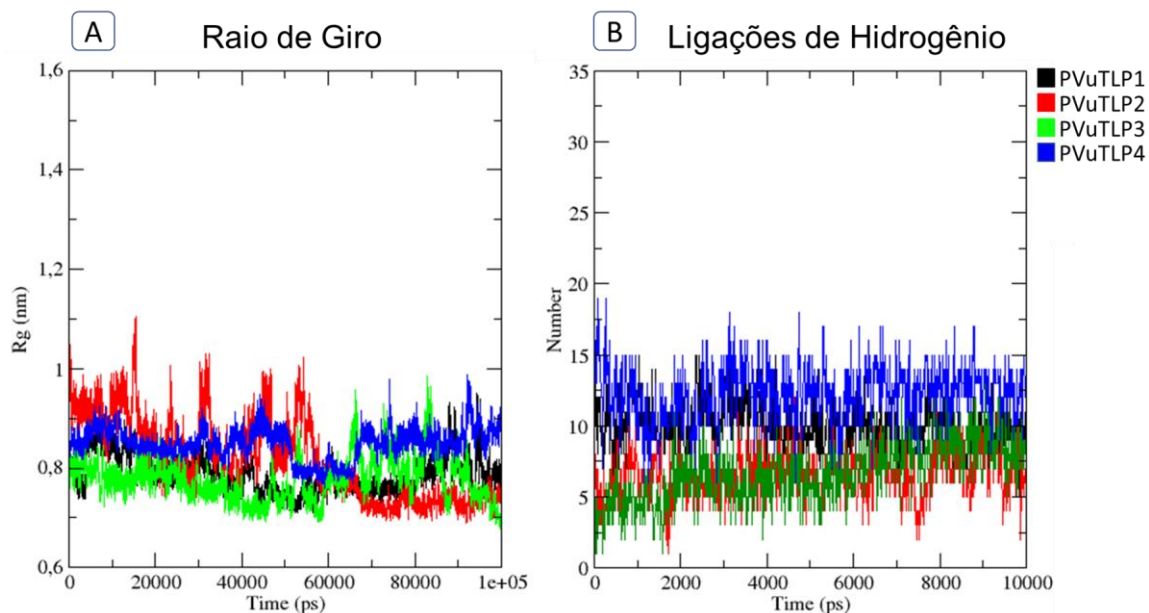


Figura 9: Representação da análise do Raio do giro (A) e do número de ligações de hidrogênio (B) dos quatro modelos teóricos das PVuTLPs racionalmente modificadas.

Em relação às ligações de hidrogênio, os modelos teóricos assemelham-se no número de ligações, com destaque para o PVuTLP4, que exibiu maior quantidade (19 ligações) em relação aos demais modelos (Figura 9.B). Mesmo que os modelos possuam suas próprias características de flutuação, foi observado que a estrutura tridimensional ainda permanece bastante semelhante após as análises de dinâmica molecular (Figura 10).

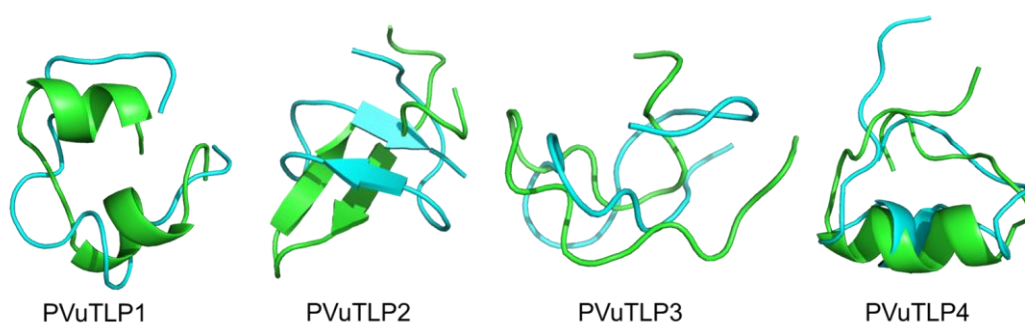


Figura 10: Modelagem tridimensional dos peptídeos. Em verde, modelos antes da dinâmica molecular. Em verde, estruturas após a análise de dinâmica molecular.

Atividade antimicrobiana *in vitro*

A avaliação do potencial antimicrobiano mostrou que PVuLTP1 apresentou inibição para a cepa bacteriana Gram-positiva testada de *S. aureus* ATCC (25923) na concentração 256 µg/ml. Para todas as Gram-negativas testadas *A. baumannii* ATCC (19606), *K. pneumoniae* ATCC (13883) e *A. baumannii* ATCC (19606) foi observado MIC 256 µg/ml, 128 µg/ml e 32 µg/ml, respectivamente. Em paralelo, PVuLTP2

mostrou atividade apenas na concentração de 1024 µg/mL em *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, PVuTLP3, enquanto inibiu o crescimento de *A. baumannii* em 512 µg/mL. Por sua vez, PVuTLP4 foi inibitório nas concentrações de 512 µg/mL para *S. aureus* e *A. baumannii*, 1024 µg/mL para *K. pneumoniae* (Tabela 5).

Tabela 5: Predição da atividade antimicrobiana *in vitro* do peptídeo PVuTLP1 contra cepas bacterianas e seu valor de MIC (Concentração Inibitória Mínima).

Peptídeo	Microrganismo	MIC
PVuTLP1	<i>Staphylococcus aureus</i>	256 µg/mL
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	256 µg/mL
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	128 µg/mL
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	32 µg/mL
PVuTLP2	<i>Staphylococcus aureus</i>	1024 µg/mL
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1024 µg/mL
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1024 µg/mL
PVuTLP3	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	512 µg/mL
PVuTLP4	<i>Staphylococcus aureus</i>	512 µg/mL
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1024 µg/mL
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	512 µg/mL

Com relação às bactérias Gram-negativas, os resultados também foram promissores. Provavelmente PVuTLP1 conseguiu interagir com a camada extra de membrana celular (camada de peptidoglicano) localizada no espaço periplasmático entre a membrana externa e interna dessas bactérias. Essa possível interação evidenciou que as estruturas externas ao envelope celular, presentes nessas bactérias, por exemplo no caso de biofilmes, não foram suficientes para impedir a ação do peptídeo [29]. Além disso, a atividade antimicrobiana *in vitro* apresentada por esse peptídeo, corroborou com os resultados *in silico*, onde foi observada atividade antimicrobiana, além de sua ação inibitória contra todas as cepas testadas, nas análises de predição.

A atividade biológica de um peptídeo, pode estar relacionada à sua polaridade, ou seja, quanto maior a predominância de cargas catiônicas em sua superfície, provavelmente, a interação com a membrana de patógenos será bem sucedida [29], uma vez que a maioria dos microrganismos patogênicos apresenta superfícies carregadas negativamente [30]. Portanto, essas características, podem justificar a atividade antimicrobiana de PVuTLP1, visto que em sua superfície predominam cargas catiônicas, favorecendo assim sua interação com a membrana do patógeno.

Ensaio de viabilidade celular (MTT)

O ensaio de citotoxicidade compreende um procedimento que visa avaliar a biocompatibilidade de um produto, isto é, o quanto este pode ser tóxico para um

determinado tipo de célula, inclusive os de potencial uso terapêutico, como os peptídeos antimicrobianos, que podem vir apresentar reações adversas. Portanto, uma vez que foi demonstrada atividade antimicrobiana para os peptídeos avaliados, tornou-se importante avaliar o potencial citotóxico de moléculas de interesse. Na avaliação da viabilidade celular das culturas de fibroblastos na presença de deferentes concentrações (16 – 1024 µg/ml) dos PVuTLPs, foi observado que nenhum dos peptídeos apresentaram diferença estatística entre as concentrações testadas. Além disso, considerando-se a viabilidade celular máxima, pode-se observar que PVuTLP1 apresentou citotoxicidade nas concentrações acima de 256 µg/ml, enquanto PVuTLP3 e PVuTLP4 as mesmas foram acima de 64 µg/ml e PVuTLP2 acima de 32 µg/ml. Além disso, é notório a relação existente entre a concentração e viabilidade, onde a medida que a concentração de PVuTLPs aumenta, a viabilidade celular tende a diminuir (Figura 11).

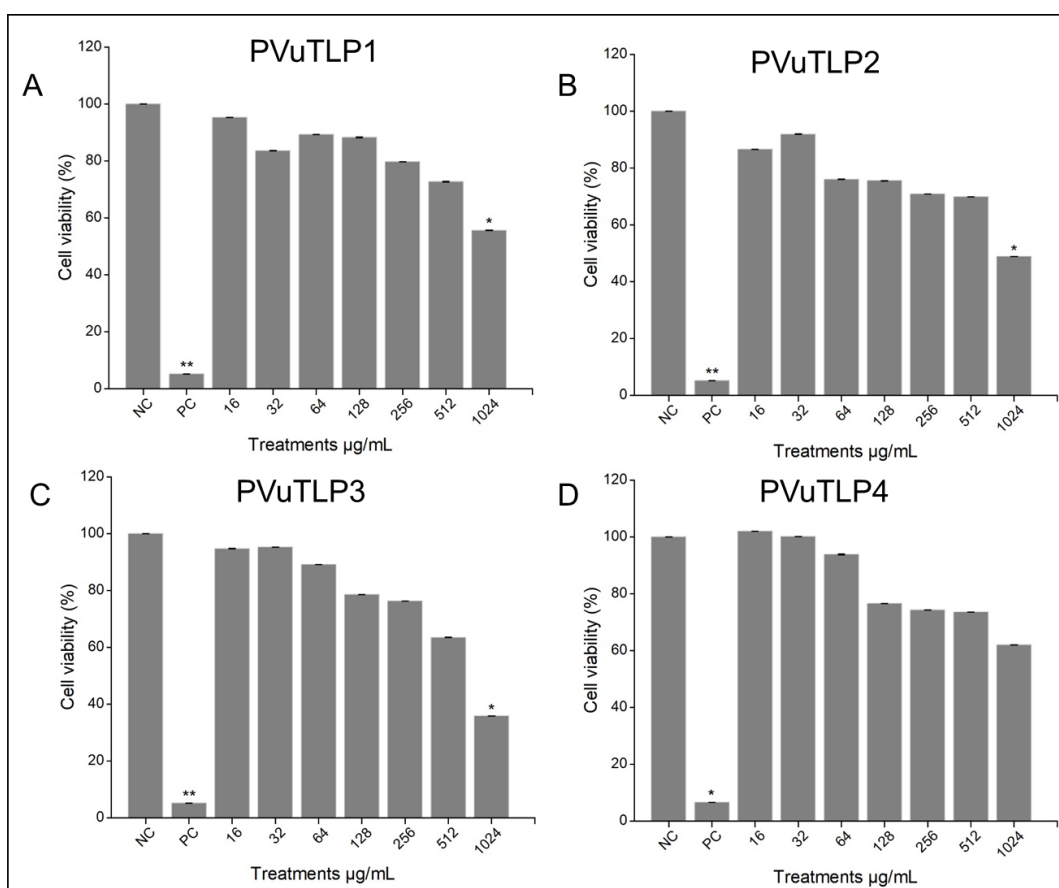


Figura 11: Viabilidade celular dos peptídeos PVuTLPs em células de macrófagos de camundongo NC (Controle Negativo) e CP (Controle Positivo). Em A: PVuTLP1, B: PVuTLP2, C: PVuTLP3 e D: PVuTLP4.

A análise mostrou resultados promissores, pois os peptídeos apresentaram comportamentos semelhantes em relação ao controle negativo, ou seja, não apresentando toxicidade para a maioria das concentrações testadas, sendo considerada viabilidade igual ou superior a 80% [31]. A respeito disso, não há um consenso na literatura sobre as concentrações consideradas antimicrobianas e ao mesmo tempo não citotóxicas [32].

Fernandes et al. [33], ao avaliarem a citotoxicidade do peptídeo natural extraído de *Bacillus sp.* (P34), através do ensaio do vermelho neutro usando células VERO, relata que o AMP apresenta comportamento citotóxico em concentrações acima de 0,5 µg/mL. Adicionalmente, Lima et al. [34] ao analisarem o efeito citotóxico de peptídeos sintéticos de defesa do hospedeiro (IDR-1002 e LL-37) em fibroblastos (L929), mediante teste do MTT, reportaram que esses peptídeos afetam a viabilidade celular em concentrações superiores a 75,0 µg/mL.

Esses estudos mostram a eficiência da abordagem metodológica empregada no presente trabalho, onde é evidenciado que os PVuTLPs projetados não exibem toxicidade, em concentrações até 512 vezes maiores que as relatadas na literatura, quando comparados a peptídeos naturais ou sintéticos sem modificações [33,34]. Os resultados aqui obtidos, corroboram com os relatados por Chen et al. [35], onde foi analisada a viabilidade celular de uma thaumatin-like natural de *Litchi chinensis* (LcTLP), mediante teste do MTT. Foi observado que essa proteína não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas (10, 25, 50, 100 e 200 µg/ml).

Por fim, quando relacionado à concentração inibitória mínima desses peptídeos com a concentração citotóxica, PVuTLP1 destaca-se pois, as concentrações que esse AMP apresentou atividade (32, 64, 128 e 258 µg/mL) não foram citotóxicas para a linhagem celular testada. Por essa razão, a partir dos resultados encontrados nessa etapa, apenas o peptídeo PVuTLP1 prosseguiu para a próxima análise.

Genotoxicidade

O método do micronúcleo baseia-se na análise da frequência de danos ocorridos ao DNA, os quais surgem durante o processo de divisão celular que, em contato com agentes clastogênicos e aneugênicos, podem gerar a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros, formando assim os micronúcleos.

As concentrações do AMP PVuTLP1 (256, 128 e 64 µg/mL) analisadas pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo, tanto para o número médio de micronúcleos (5,44 a 6,56 MN/ 3000 células) (Figura 12.A), brotos nucleares (1,67 a 2,33 MN/ 3000 células) (Figura 12.B), quanto de pontes nucleoplasmáticas (0,33 a 1,67 MN/ 3000 células) (Figura 12.C), demonstrando ausência de genotoxicidade (Tabela 6).

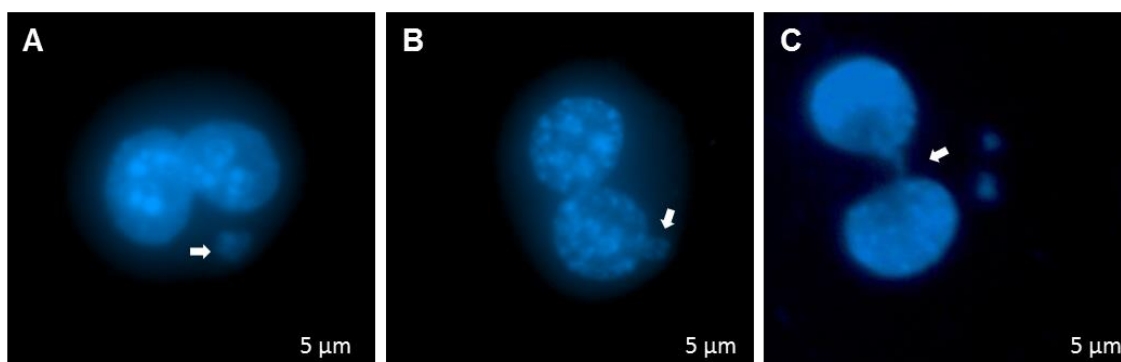


Figura 12: Alterações encontradas no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN). É apontado em (A) Micronúcleo, (B) Broto nuclear e (C) Ponte nucleoplasmática.

Tabela 6: Alterações nucleares em células de macrófagos de camundongo (L929) após exposição ao peptídeo PVuTLP1.

Peptídeo	Alterações	Tratamento $\mu\text{g/mL}$	Média $\pm$ DP	Alterações totais $\pm$ DP	NCDI
PVuTLP1	MN	CN	4,78 $\pm$ 1,31 a	7,56 $\pm$ 1,88 a	1,70 a
		CP	53,67 $\pm$ 7,39 b	69,44 $\pm$ 8,93 c	1,23 b
		256	6,56 $\pm$ 1,07 a	9,11 $\pm$ 2,60 a	1,70 a
		128	5,44 $\pm$ 1,50 a	7,33 $\pm$ 2,00 a	1,67 a
		64	6,56 $\pm$ 1,34 a	8,22 $\pm$ 1,23 a	1,67 a
	BR	CN	2,78 $\pm$ 1,47 a		
		CP	15,44 $\pm$ 3,56 d		
		256	2,33 $\pm$ 1,83 a		
		128	1,78 $\pm$ 1,40 a		
		64	1,67 $\pm$ 1,49 a		
	PN	CN	0,00 $\pm$ 0,00 a		
		CP	0,33 $\pm$ 0,67 a		
		256	1,67 $\pm$ 1,05 a		
		128	1,00 $\pm$ 1,25 a		
		64	0,33 $\pm$ 0,67 a		

*MN: Micronúcleo, BR: Broto nuclear, PN: Ponte nucleoplasmática, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo e NCDI.

Além disso, a partir de análises de citotoxicidade através das avaliações da ocorrência de células trinucleadas e tetranucleadas e da análise estatística, pelo teste Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$), foi observado que o número de alterações totais apresentados pelo controle negativo não foi estatisticamente significativo comparativamente às concentrações de PVuTLP1 testadas. Sendo assim, não houve toxicidade celular em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 6).

Referências

- [1] Daniali, M. Nikfar, S. Abdollahi, M. **Antibiotic resistance propagation through probiotics**. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 16 (2020), pp. 1207-1215.
- [2] Hernando-Amado, S. Coque, T. M. Baquero, F. Martínez, J. L. **Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives**. Nature Microbiology, 49 (2019), pp. 1432-1442.
- [3] Baptista, A. Gonçalves, R. V. Bressan, J. Pelúzio, M. D. C. G. **Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts and fractions of cashew (*Anacardium occidentale* L.), cajui (*Anacardium microcarpum*), and pequi (*Caryocar brasiliense* C.): a systematic review**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 24 (2018), pp. 217-233.
- [4] Rozman, N. A. S. Tong, W. Y. Leong, C. R. Tan, W. N. Hasanolbasori, M. A. Abdullah, S. Z. **J Microbiol Biotechnol**, 29 (2019), pp 1009-1013.
- [5] Boparai, J. K. Sharma, P. K. **Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications**. Protein and peptide letters, 27 (2020), pp 4-16.

- [6] Santos-Silva, C. A. D. et al. **Plant antimicrobial peptides: state of the art, in silico prediction and perspectives in the omics era.** *Bioinformatics and biology insights*, 14 (2020), pp. 1177932220952739.
- [7] Rodríguez-Decuadro, S. Rosa, G. Radío, S. Barraco-Vega, M. Benko-Iseppon, A. M. **Antimicrobial peptides in the seedling transcriptome of the tree legume *Peltophorum dubium*.** *Biochimie*, 180 (2021), pp. 229-242.
- [8] Santos-Silva, C. A. et al. **Cassava (*Manihot esculenta*) defensins: Prospection, structural analysis and tissue-specific expression under biotic/abiotic stresses.** *Biochimie*, 37 (2021), pp. 254-264.
- [9] Mandal, S.M. Dey, S. Mandal, M. Sarkar, S. Maria-neto, S. Franco, O.L. **Identification and structural insights of three novel antimicrobial peptides isolated from green coconut water.** *Peptides*, 30 (2009), pp. 633-637.
- [10] Martin, E. C. et al. **Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 resists staphylococcal protein modulation by antibiotics and antimicrobial peptides.** *International journal of antimicrobial agents*, 45 (2015), pp. 19-24.
- [11] Van Loon, L. C. Van Kammen, A. **Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun" and „Samsun NN" changes in protein constitution after infection with TMV.** *Virology*, 40 (1970), pp. 199-211.
- [12] Freitas, B. L. Bered, F. In: **Genética e evolução vegetal.** 1ª ed. Rio Grande do Sul: UFRGS, (2003), pp. 463.
- [13] Jesus-pires, C. et al. **“Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications.”** *Current Protein & Peptide Science*, 20 (2019).
- [14] Wang, F. et al. **TaTLP1 interacts with TaPR1 to contribute to wheat defense responses to leaf rust fungus.** *PLoS genetics*, 16 (2020), pp. e1008713.
- [15] Jiao, W. Li, X. Zhao, H. Cao, J. Jiang, W. **Antifungal activity of an abundant thaumatin-like protein from banana against *Penicillium expansum*, and its possible mechanisms of action.** *Molecules*, 23 (2018), pp. 14-42.
- [16] Chen, H. Wang, K. Xiao, H. Hu, Z. Zhao, L. **Structural Characterization and Pro-inflammatory Activity of a Thaumatin-Like Protein from Pulp Tissues of *Litchi chinensis*.** *Journal of agricultural and food chemistry*, 68 (2020), pp. 6439-6447.
- [17] Emami, A. Javanmardi, F. Pirbonyeh, N. **Antibiotic resistant profile of asymptomatic bacteriuria in pregnant women: a systematic review and meta-analysis.** *Expert Rev Anti Infect*, 18 (2020), pp. 807-815.

- [18] Mosmann, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of immunological methods, 65 (1983), pp. 55-63.
- [19] Van Der Oost, R. Beyer, J. Vermeulen, N. P. E. **Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review**. Environmental Toxicology and Pharmacology, 13 (2003), pp. 57-149.
- [20] Altschul, S. F. GISH, W. MILLER, W. MYERS, E. **Basic local alignment search tool**. Journal of Molecular Biology, 215 (1990), pp. 403-410.
- [21] Waghu, F. H. et al. CAMPR₃: **A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides**. Nucleic Acids Research, 44 (2016), pp. D1094-D1097.
- [22] Mishra, N. K. Singla, D. Agarwal, S. Raghava, G. P. **ToxiPred: a server for prediction of aqueous toxicity of small chemical molecules in T. Pyriformis**. Journal of Translational Toxicology, 11 (2014), pp. 21-27.
- [23] Berendsen, H. J. C. Postma, J. P. M. Van Gunsteren, W. F. Hermans, J. **Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration**. In: Pullman B (ed) Intermolecular Forces. Springer Netherlands, Dordrecht, 32 (1981), pp. 331-342.
- [24] Hess, B. Bekker, H. Berendsen, H. J. C. Fraaije, J. G. E. M. **LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations**. Journal of Computational Chemistry 18 (1997), pp. 1463-1472.
- [25] Hockney, R. W. **Methods in Computational Physics**, Academic, New York, 9 (1970), pp. 135.
- [26] Ostenbrink, C. Villa, A. Mark, A. E. Van Gunsteren, W. F. **The biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6**. Journal of Computational Chemistry, 25 (2004), pp. 1656-1676.
- [27] Thomas, S. et al. **CAMP: A useful resource for research on antimicrobial peptides**. Nucleic Acids Research, 38 (2009), pp. 774-780.
- [28] Waghu, F. H. et al. **CAMPR₃: A database on sequences, structures and signatures of antimicrobial peptides**. Nucleic Acids Research, 44 (2016), pp. D1094–D1097.
- [29] Jourdain, M. L. Velard, F. Pierrard, L. Sergheraert, J. Gangloff, S. C. Braux, J. **Cationic antimicrobial peptides and periodontal physiopathology: A systematic review**. J Periodontal Res, 54 (2019), pp. 589-600.
- [30] Kreve, S. Cândido, R. A. **Influence of the electrostatic condition of the titanium surface on bacterial adhesion: A systematic review**. J Prosthet Dent.125 (2021), pp. 416-420.

- [31] Fenech, M. et al. **Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells.** *Mutagenesis*, 26 (2021), pp. 125-132.
- [32] Namour, M. Theys, S. **Revascularização pulpar de dentes permanentes imaturos: revisão da literatura e proposta de novo protocolo clínico.** *The Scientific World Journal*, 14 (2014), pp. 87-103.
- [33] Fernandes, M. H. V. **Avaliação da citotoxicidade do peptídeo antimicrobiano P34.** *Science and Animal Health*, 11 (2013), pp. 02-10.
- [34] Lima, S. M. et al. **Tratamento baseado em peptídeos antimicrobianos para infecções endodônticas - inovação biotecnológica em endodontia.** *Avanços da biotecnologia*, 33 (2015), pp. 203-213
- [35] Chen, H. Wang, K. Xiao, H. Hu, Z. Zhao, L. **Structural Characterization and Pro-inflammatory Activity of a Thaumatin-Like Protein from Pulp Tissues of Litchi chinensis.** *Journal of agricultural and food chemistry*, 68 (2020), pp. 6439-6447.

5 CONCLUSÕES

Foram desenvolvidos quatro peptídeos antimicrobianos, bioinspirados em *V. unguiculada* com potencial para o criação de novas drogas, com abordagem para tratamento de infecções causadas por alguns microrganismos humanos. Nas análises estruturais, a maioria dos modelos apresentaram formação de estrutura secundária. A avaliação da estabilidade dos PVuTLPs mostrou pouca modificação estrutural, mantendo sua estrutura secundária durante as simulações de dinâmica molécula.

Todos os peptídeos mostraram atividade antimicrobiana *in vitro*, destacando o PVuTLP1, que também mostrou-se promissor na avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade, sendo esse peptídeo racionalmente desenhados um possível candidato para uso em tratamento contra infecções bacterianas em humanos.

Por fim, o desenho racional foi eficiente para potencializar a atividade antimicrobiana do modelo teórico e minimizar o potencial toxicológico característicos dessa classe de moléculas. Além disso, a avaliação estrutural e funcional dos AMPs racionalmente desenhados, representou uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com potencial para combater microrganismos que estão na lista de urgência da OMS (Organização Mundial de Saúde).

REFERÊNCIAS

- AHN, H. S. et al. Design and Synthesis of Novel Antimicrobial Peptides On The Basis Of A Helical Domain Of Tenecin 1, An Insect Defensin Protein, And Structure-Activity Relationship Study. **Peptides**, v. 27, n. 4, p. 640-648, 2006.
- ALI, S. et al. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 212, p. 29-37, 2018.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D.; KUBICEK-SUTHERLAND, J. Z. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Drug Resist. Updat.** v. 2, n. 6, p. 43-57, 2016.
- ARORA, R. et al. Proteínas relacionadas à patogênese: uma defensina para plantas, mas um alérgeno para humanos. **Jornal Internacional de macromoléculas biológicas**, v. 157, p. 659-672, 2020.
- AZANI, N. et al. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
- BARROSO, L. M. A. et al. Using artificial neural networks to select upright cowpea (*Vigna unguiculata*) genotypes with high productivity and phenotypic stability. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 4, 2016.
- BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 2017.
- BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 2017.
- BECHINGER, B.; GORR, S. U. Antimicrobial peptides: mechanisms of action and resistance. **Journal of dental research**, v. 96, n. 3, p. 254-260, 2017.
- BEER, A.; VIVIER, M. A. Vv-AMP1, a ripening induced peptide from *Vitis vinifera* shows strong antifungal activity. **BMC plant biology**, v. 8. N. 1, p. 75, 2008.
- BREITENEDER, H. Thaumatin-like proteins—a new family of pollen and fruit allergens. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 479-481, 2004.
- BREITENEDER, H. Thaumatin-like proteins—a new family of pollen and fruit allergens. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 479-481, 2004.
- CARDOSO, M. H. **ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME DE DOIS PEPTÍDEOS HELICOIDAIS: PA-MAP 1.9 E ECDBS1R5**. 2019. 199 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília.

CARDOSO, M. H. et al. A Computationally Designed Peptide Derived from *Escherichia coli* as a Potential Drug Template for Antibacterial and Antibiofilm Therapies. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1727-1736, 2018.

CARVALHO, L. A. C., MACHINI, M.T. Hemocidinas derivadas da hemoglobina: Estruturas, propriedades e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 3, n. 6, p. 1021-1029, 2013.

CHAHARDOLI, M.; FAZELI, A.; GHABOOLI, M. Recombinant production of bovine Lactoferrin-derived antimicrobial peptide in tobacco hairy roots expression system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 414-421, 2018.

CHEN, J. et al. NPR1 promotes its own and target gene expression in plant defense by recruiting CDK8. **Plant physiology**, v. 181, n. 1, p. 289-304, 2019.

CHEN, X. et al. Roles and mechanisms of human cathelicidin LL-37 in cancer. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 1060-1073, 2018.

CHEN, Y. et al. Rational Design of Helical Antimicrobial Peptides with Enhanced Activities and Specificity/Therapeutic Index. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12316-12329, 2005

CÔELHO, J. D. Produção de grãos – Feijão, milho e soja. Caderno setorial ETENE. **Banco do Nordeste**, n. 33, 2018.

COSTA, J. P. et al. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 9, n. 4, p. 2023-2040, 2015.

Cowpea Genomics (2008), <http://cowpeagenomics.med.virginia.edu/> (12 de janeiro de 2022).

CUSTERS, J. et al. Isolation and characterisation of a class of carbohydrate oxidases from higher plants, with a role in active defence. **The Plant Journal**, v. 39, n. 2, p. 147-160, 2004.

DELGADO-SALINAS, A. et al. *Vigna* (Leguminosae) sensu lato: the names and identities of the American segregate genera. **American Journal of Botany**, v. 9, n. 8, p. 1694-1715, 2011.

DIAMOND, G. et al. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 21, p. 2377-2392, 2009.

EMAMIFAR, S. et al. Molecular characterization and evaluation of the antibacterial activity of a plant defensin peptide derived from a gene of oat (*Avena sativa* L.). **Phytochemistry**, v. 181, p. 112586, 2021.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines: report and qualitative risk assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products**. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, 1999.

EYLER, R. F.; SHVETS, K. Clinical pharmacology of antibiotics. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 1080-1090, 2019.

FAUS, I. Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 53, n. 2, 145-151, 2000.

FIERENS, E. et al. Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 646-654, 2009.

FIERENS, E. et al. Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 646-654, 2009.

FIERENS, E. et al. TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family. **Biochem J**, v. 4, n. 3, p. 583-591, 2007.

FIERENS, E. et al. Xylanase inhibitors bind to nonstarch polysaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 564-70, 2008.

FJELL, C. D. et al. Designing Antimicrobial Peptides: Form Follows Function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37-51. 2012.

FJELL, C. D. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 37-51, 2012.

FREIRE-FILHO, F. R. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. **Embrapa Meio-Norte-Livro científico (ALICE)**, 2011.

FRY, J. C. **Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings**; Baines, D.; Seal, R., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, pp. 41-75, 2012.

GHAFOO, A. et al. Genetic diversity in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper). **Field Crop Res**, v. 6, n. 9, p. 183-190, 2001.

GOWDA, C. T.; PURAMA, S. N. S.; KAMMARA, R. TLPdb: A Resource for Thaumatin-Like Proteins. **The Protein Journal**, v. 39, n. 4, p. 301-307, 2020.

GUANÍ-GUERRA, E. et al. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1-11, 2010.

GUANÍ-GUERRA, E. et al. Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. **Clinical Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1-11, 2010.

HAESE, D.; SILVA, B. A. N. Antibióticos como promotores de crescimento em monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 1, p. 07-19, 2004.

HANEY, E. F.; MANSOUR, S. C.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial peptides: an introduction. **Antimicrobial Peptides**, p. 3-22, 2017.

HARRISON, P. L. et al. **Antimicrobial peptides from scorpion venoms** *Toxicon*, 2014.

HILOVAARA-TEIJO, M. et al. Snowmold- induce apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. **Plant Physiology**, v. 12, n. 11, p. 665-674, 1999.

HU, Z.; ZHANG, H.; SHI, K. Plant peptides in plant defense responses. **Plant signaling & behavior**, v. 13, n. 8, p. e1475175, 2018.

HUANG, Y.; HUANG, J.; CHEN, Y. Alpha-helical Cationic Antimicrobial Peptides: Relationships of Structure and Function. **Protein & Cell**, v. 1, n.2, p. 143-152. 2010.

IRAZAZABAL, L. N. et al. Selective Amino Acid Substitution Reduces Cytotoxicity of the Antimicrobial Peptide Mastoparan. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, n. 11, p. 2699-2708, 2016.

JABER, E. et al. A gene encoding scots pine antimicrobial protein Sp-AMP2 (PR-19) confers increased tolerance against *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. **Forests**, v. 9, n. 1, p. 10, 2018.

JAVADPOUR, M. M. et al. De Novo Antimicrobial Peptides with Low Mammalian Cell Toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 3107-3113, 1996.

JESÚS-PIRES, C. et al. Plant thaumatin-like proteins: function, evolution and biotechnological applications. **Current Protein and Peptide Science**, v. 21, n. 1, p. 36-51, 2020.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal: Um enfoque filogenético**. 3. Ed. Porto alegre: Artmed, p. 612, 2008.

KAAS, Q.; WESTERMANN, J. C.; CRAIK, D. J. CONOPEPTIDE characterization and classifications: an analysis using ConoServer. **Toxicon**, v. 55, n. 8, p. 1491-1509, 2010.

KIM, H. et al. Development of a novel hybrid antimicrobial peptide for targeted killing of *Pseudomonas aeruginosa*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 185, p. 111814, 2020.

KIM, J. et al. Antimicrobial activity of antimicrobial peptide LPcin-YK3 derived from bovine lactophorin. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 1299-1309, 2018.

KOTSIANTIS, S. B. Supervised Machine Learning: A Review of Classification Techniques. **Informatica**, v. 31, p. 249-268. 2007.

LAZZARO, B. P.; ZASLOFF, M.; ROLFF, J. **Antimicrobial peptides: Application informed by evolution**, v. 487, p. 247-261, 2020.

LAZZARO, B. P.; ZASLOFF, M.; ROLFF, J. **Antimicrobial peptides: Application informed by evolution**. v. 487, n. 1, p. 276-287, 2020.

LE, C.F. et al. Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 4, p. e02340-16, 2017.

LEBEDEVA, A. A. et al. Bactericide, immunomodulating, and wound healing properties of transgenic *Kalanchoe pinnata* synergize with antimicrobial peptide cecropin P1 in vivo. **Journal of immunology research**, v. 2017, 2017.

LEE, T. H.; HALL, K. N.; AGUILAR, M. I. Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. **Curr. Top. Med. Chem**, v. 1, n. 6, p. 25-39, 2015.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian journal of microbiology**, v. 65, n. 1, p. 34-44, 2019.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the world**. Royal Botanical Gardens, 2005, Kew. 592p.

LIMA, H. C. et al. Fabaceae In: FORZZA, R. C. et al. (orgs) **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. v. 18, n. 2, p. 39-47, 2012.

LIU, J. et al. Gene Cloning, Expression, and Antifungal Activities of Permatin from Naked Oat (*Avena nuda*). **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 1, p. 299-309, 2019.

LIU, J.; HAN, D.; SHI, Y. Gene Cloning, Expression, and Antifungal Activities of Permatin from Naked Oat (*Avena nuda*). **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 11, n. 1, p. 299-309, 2019.

LOOSE, C. et al. A linguistic Model for the Rational Design of Antimicrobial Peptides. **Nature**, v. 443, p. 867-869, 2006.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MANT, C. T. et al. De novo Designed Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides Incorporating Dab and Dap Residues on the Polar Face to Treat the Gram-negative Pathogen, *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 7, p. 3354-3366, 2019.

MARCOS, J. F. et al. Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 273-301, 2008.

MCKENNA, M. Antibiotic resistance: The last resort. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 394-396, 2013.

MCKENNA, M. Antibiotic resistance: The last resort. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 394-396, 2013

MEMARIANI, H. et al. Mechanism of Action and In Vitro Activity of Short Hybrid Antimicrobial Peptide PV3 Against *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 1, p. 103-108, 2016.

NG, N.Q.; MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin germ plasm. In: Sinch SR, Rachie KO, eds. Cowpea research, production and utilization. **Chichester, John Wiley**, v. 1, n. 1, p.11-21, 1985.

NOONAN, J.; WILLIAM, W.; SHAN, X. Investigation of antimicrobial peptide genes associated with fungus and insect resistance in maize. **International journal of molecular sciences**, v.18, n.9, p.1938, 2017.

PAG, U. et al. Analysis of in Vitro Activities and Modes of Action of Synthetic Antimicrobial Peptides Derived from an alpha Helical 'Sequence Template'. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 341-352, 2008.

PARK, J. et al. Spread of multidrug-resistant *Escherichia coli* harboring integron via swine farm waste water treatment plant. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p.36-42, 2018.

PASTORINO, G. et al. Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. **Phytotherapy research**, v. 32, n. 12, p. 2323-2339, 2018.

PASUPULETI, M. et al. End-Tagging of Ultra-Short Antimicrobial Peptides by W/F Stretches to Facilitate Bacterial Killing. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, p.1-9, 2009.

PERUTKA, Z. et al. High-proline proteins in experimental hazy white wine produced from partially botrytized grapes. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 66, n. 3, p. 398-411, 2019.

PETRE, B. et al. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC Plant Biology**, v. 2, n. 4, p. 21-33, 2011.

PETRE, B. et al. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC Plant Biology**, v. 1, n. 3, p. 11-33., 2011.

PORTO, W. F.; PIRES, A. S.; FRANCO, O. L. Computational Tools for Exploring Sequence Databases as a Resource for Antimicrobial Peptides. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 3, p. 337-349, 2017.

REIMMANN, C.; DUDLER, R. cDNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced thaumatin-like protein from rice (*Oryza sativa*). **Plant Physiology**, v. 10, n. 1, p. 1113-1114, 1993.

ROBINSON, J. A. Protein Epitope Mimetics as Anti-Infectives. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 3, p. 379-386, 2011.

ROSCIA, G. et al. The development of antimicrobial peptides as new antibacterial drugs. **Current Protein and Peptide Science**, v. 14, n. 8, p. 641-649, 2013.

SAEIDI, M.; ZAREIE, R. Prediction, isolation, overexpression and antifungal activity analysis of *Medicago truncatula* var. *truncatula* putative thaumatin like proteins (TLP-1,-2,-3,-4 and-5). **Turkish Journal of Biology**, v. 44, n. 4, p. 176-187, 2020.

SALA, A. et al. Novel *Naja atra* cardiotoxin 1 (CTX-1) Derived Antimicrobial Peptides with Broad Spectrum Activity. **PLoS ONE**, v. 13, n.1, p. 1-22, 2018.

SALDITT, T.; LI, C.; SPAAR, A. Structure of antimicrobial peptides and lipid membranes probed by interface-sensitive X-ray scattering. **Biochim Biophys Acta**, v. 9, n. 17, p. 1483-1498, 2006.

SANTOS, C. A. F. et al. Genetic analysis of total seed protein content in two cowpea crosses. **Crop Science**, v. 52, p. 2501-2506, 2012.

SANTOS-SILVA, C. A. et al. Plant antimicrobial peptides: state of the art, in silico prediction and perspectives in the omics era. **Bioinformatics and biology insights**, v. 14, p. 1177932220952739, 2020

SANTOS-SILVA, C. A. et al. M.Cassava (*Manihot esculenta*) defensins: Prospection, structural analysis and tissue-specific expression under biotic/abiotic stresses. **Biochimie**, 2021

SCHMIDTCHEN, A. et al. Boosting Antimicrobial Peptides by Hydrophobic Oligopeptide End Tags. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17584-17594, 2009.

SELS, J. et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941-950, 2008.

SEO, M. D. et al. Antimicrobial peptides for therapeutic applications: A review. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12276-12286, 2012.

SHADRACH, O.A.; OYEBIODUN, G.L. The physicofunctional characteristics of starches from cowpea (*Vigna unguiculata*), pigeon pea (*Cajanus cajan*) and yambean (*Sphenostylis stenocarpa*). **Food Chemistry**, London, v. 65, p. 469-474, 1999.

SHARMA, A. et al. Thaumatin-like protein kinases: Molecular characterization and transcriptional profiling in five cereal crops. **Plant Science**, v. 290, p. 110317, 2020.

SHARMA, A. et al. Thaumatin-like protein kinases: Molecular characterization and transcriptional profiling in five cereal crops. **Plant Science**, v. 290, p. 110317, 2020.

SHELENKOV, A. A.; SLAVOKHOTOVA, A. A.; ODINTSOVA, T. I. Cysmotif searcher pipeline for antimicrobial peptide identification in plant transcriptomes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 83, n. 11, p. 1424-1432, 2018.

SILVA, O. N. et al. An Anti-Infective Synthetic Peptide with Dual Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-11, 2016.

SINGH, A. et al. Antifungal proteins: potent candidate for inhibition of pathogenic fungi. **Current Bioactive Compounds**, v. 9, n. 2, p. 101-112, 2013.

SINGH, N. K. et al. Characterization of a Pathogen Induced Thaumatin-Like Protein Gene AdTLP from *Arachis diogeni*, a Wild Peanut. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

SOUZA, N. M.; SOUZA, L. A. G. Levantamento do potencial de aproveitamento das leguminosas no distrito da Barreira do Andirá, Barreirinha, AM. **Enciclopédia Biosfera-Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n.12, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Plantarum**, Nova Odessa, 2005.

SUN, E. et al. Host Defense (Antimicrobial) Peptides. In: *Koutsopoulos, S. (Org.). Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. **Elsevier Ltd**, v. 10, n. 2, p. 253-285, 2018.

SUNDAR, A. et al. Induction of pathogenesis-related proteins in sugarcane leaves and cell-cultures by a glycoprotein elicitor isolated from *Colletotrichum falcatum*. **Biologia Plantarum**, v.52, n.2, p.321-328, 2008.

TAKAHASHI, T.; YAMASAKI, K. Psoriasis and antimicrobial peptides. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 18, p. 6791, 2020.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 127-138, 2000.

TORRES, J.; PETERS, M.; MONTOYA, C. A. Boiling influences the nutritional value of three seed cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties using in vivo and in vitro methods. **Food chemistry**, v. 297, p. 124940, 2019.

TOSSI, A.; TARANTINO, C.; ROMEO, D. Design of Synthetic Antimicrobial Peptides Based on Sequence Analogy and Amphipathicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 250, n. 2, p. 549-558, 1997.

ULLAH, A. et al. Osmotin: a plant defense tool against biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 149-159, 2018.

VAN DER WEL, H.; LOEWE, K. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. **Eur J Biochem**, v. 3, n. 1, p. 221-225, 1972.

VAN DER WEL, H; LOEWE, K. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. **Eur J Biochem**, v. 3, n 1, p. 221-225, 1972.

VELAZHAHAN, R.; DATTA, SK.; MUTHUKRISHNAN, S. The PR-5 family: thaumatin-like proteins. In *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. **CRC Press**, Boca Raton, v. 1, n. 1, p. 107-129, 1999.

VELAZHAHAN, R.; DATTA, S.K.; MUTHUKRISHNAN, S. (1999) The PR-5 family: thaumatin-like proteins. In *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. **CRC Press**, v. 1, n. 1, p. 107-129, 1999.

VOS, A.M. et al. Three-dimensional structure of thaumatin I, an intensely sweet protein. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v. 82, n. 5, p. 1406-1409, 1985.

WANDERLEY-NOGUEIRA, A. et al. An overall evaluation of the Resistance (R) & Pathogenesis Related (PR) superfamilies in soybean, as compared with Medicago & Arabidopsis. **Genetics & Molecular Biology**. v.35, n.1, p.260-271, 2012a.

WANDERLEY-NOGUEIRA, A. et al. Insight on pathogen defense mechanisms in the sugarcane transcriptome. **Functional Plant Science Biotechnology**, v.6, p.134-148, 2012b.

WANG, L.; DUMAN, J. G. A thaumatin-like protein from larvae of the beetle *Dendroides canadensis* enhances the activity of antifreeze proteins. **Biochemistry**, v. 31, n. 45, p. 1278-1284, 2006.

WANG, Y. et al. Computer-Aided Design, Structural Dynamics Analysis, and In Vitro Susceptibility Test of Antibacterial Peptides Incorporating Unnatural Amino Acids Against Microbial Infections. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 13, n. 4, p. 215-223, 2016.

YASMIN, N. et al. Molecular characterization, structural modeling, and evaluation of antimicrobial activity of Basrai thaumatin-like protein against fungal infection. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

YU XM, GRIFFITH M. Antifreeze proteins in winter rye leaves form oligomeric complexes. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1361-70, 1999.

YU, J. et al. Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin films. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 39, p. 15680-15685, 2013.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms: my perspective. **Antimicrobial Peptides**, v. 2, n. 1, p. 3-6, 2019.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHU, T.; Song, F.; Zheng, Z. Molecular characterization of the rice pathogenesis-related protein, OsPR-4b, and its antifungal activity against *Rhizoctonia solani*. **Journal of phytopathology**, v.154, n.6, p.378-384, 2006.

ANEXO A - REGRAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA BIOCHIMIE

ARTICLE STRUCTURE

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results and Discussion

Results should be clear and concise. This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

ESSENTIAL TITLE PAGE INFORMATION

- **Title:** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations:** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author:** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address:** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

HIGHLIGHTS

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). Abstract A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason,

References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Artwork

Image manipulation Whilst it is accepted that authors sometimes need to process images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud constitutes scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. Images of gels and blots may be adjusted digitally provided that the following conditions are observed: Adjustments to brightness, contrast, or color balance are allowed provided that they are applied equally to all pixels in the image, and that they do not obscure or misrepresent any information present in the original image. Non-linear adjustments to density (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend. Backgrounds should be grey and not white or black, so as not to mask additional bands. Where images of gels or blots are cropped, a minimum of at least three band widths should be maintained above and below the cropped bands. Where images in figures have been cropped or adjusted in density, the original unadjusted images with a complete legend should be made available on request to referees and editors, who may require that they be included in supplementary material. Suitable controls, including molecular weight markers, must be shown on all images of gels and blots, and controls should be run on the same gel as the samples. The grouping of bands originating from different blots or gels in a single figure panel is strongly discouraged, and should be employed only when the nature and scale of the experiment make such grouping necessary. It must be made explicit in the figure legend. When figures show non-adjacent bands from the same or different blots or gels, this should be clearly indicated

by white spaces or vertical lines, and the original complete image or images should be made available on request to referees and editors, who may require them to be included in supplementary material.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available. **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010), pp. 51–59.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205.

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020.

ANEXO B - ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Capítulos de Livros Publicados

Vilela, L. M. B.; Silva, C. A. S.; Roldan filho, R. S.; Araujo, S. S.; Ferreira-Neto, J. R. C.; **Dias-de-Oliveira, W.**; Amorim, L. L. B.; Pandolfi, V.; Benko-Iseppon, A. M. *Cenostigma pyramidale: Ethnomedicinal Properties and Perspectives on A Legume Tree Highly Adapted to Semiarid 'Caatinga' Region* In: *Ethnopharmacology of Wild Plants*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2021, v.11, p. 218-233.

Amorim, L. L. B.; Nicoli, A.; Ferreira-Neto, J. R.; Ferreira, J. D. C.; Borges, A. N. C.; Pires, C. J.; Araujo, F. T.; Araujo, F. C.; Matos, M. K. S.; **Dias-de-Oliveira, W.**; Costa, A. F.; Benko-Iseppon, A. M. *Viroses em feijão-caupi: fontes de resistência, marcadores moleculares, ômicas e biotecnologia* In: *Resistência de Plantas a Patógenos*. 1 ed. Recife: Editora UFRPE, 2021, v.1, p. 211-241.

Artigos completos publicados em periódicos

Amador, Vinícius costa; Santos-Silva, Carlos André dos; Vilela, Lívia Maria Batista; Oliveira-Lima, Marx; de Santana Rêgo, Mireli de Santana; Roldan-Filho, Ricardo Salas; Oliveira-Silva, Roberta Lane de; Lemos, Ayug Bezerra; **de Oliveira, Wilson Dias de**; Ferreira-Neto, José Ribamar Costa; Crovella, Sérgio; Benko-Iseppon, Ana Maria *Lipid Transfer Proteins (LTPs)-Structure, Diversity and Roles beyond Antimicrobial Activity*. *Antibiotics-Basel*. Fator de Impacto (2020 JCR): 4,6390, v.10, p.1281, 2021.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

Silva, P. V. G.; Gomes, S. F.; Dias-de-Oliveira, W.; Barros, M. A. M. In: XXIII Encontro de Genética do Nordeste, 2021, Petrolina. *Anais do XXIII Encontro de Genética do Nordeste*. 2021.

Dias-de-Oliveira, W.; Vilela, L. M. B.; Silva, C. A. S.; Pires, C. J.; Benko-Iseppon, A. M. *desenho racional de peptídeos derivados de thaumatin-like de *Vigna unguiculata* L.*

(walp.) com potencial ação antimicrobiana In: XXIII Encontro de Genética do Nordeste, 2021, Petrolina. Anais do XXIII Encontro de Genética do Nordeste. 2021.

OUTRAS ATIVIDADES

Apresentação de trabalho e palestra

“Leucaena leucocephala pod seed protein as an alternate to animal protein in fish feed and evaluation of its role to fight against infection caused by *Vibrio harveyi* and *Pseudomonas aeruginosa*, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Mesa Temática: Tecnologia Assistivas E A Educação, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Variabilidade genética entre acessos contrastantes do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) utilizando marcadores moleculares”, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Assessoria e consultoria

Análise de mapas conceituais e desenvolvimento de questões na área de biologia para implementação no Quiz “AqquApp”, 2019.

Análise técnica e funcional de equipamentos para laboratório de Ciências e Biologia, 2019.

Trabalhos técnicos

Revisor do trabalho do capítulo de livro: **A equidade do sus no atendimento ao imigrante venezuelano: testagem rápida de ist/hiv/aids/hepatites virais**, 2021. Revista (Omnis Scientia).

Revisor do trabalho do capítulo de livro: **A incidência da leishmaniose visceral canina no nordeste brasileiro**, 2021. Revista (Omnis Scientia).

Revisor do trabalho do capítulo de livro: **Análise epidemiológica dos casos de tuberculose notificados por uma unidade básica de saúde em belém**, 2021. Revista (Omnis Scientia).

Revisor do trabalho do capítulo de livro: **Importância da educação alimentar e nutricional para crianças na fase pré-escolar: Uma revisão da literatura**, 2021. Revista (Omnis Scientia).

Participação em banca de comissões julgadoras

Avaliador de projetos no **25ª Ciência Jovem**, 2019 Espaço Ciência-Recife.

Avaliador de sessão de pôster no **Congresso de Iniciação Científica** da UFRPE, 2019 Universidade Federal Rural de Pernambuco-Recife.

Avaliador de Trabalhos na **Semana Nacional de Ciência e Tecnologia**, 2019 Universidade Federal de Pernambuco-Recife.

Moderador do X Ciclo de Seminários em Genética e Biotecnologia Vegetal, realizado pelo Departamento de Genética, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, moderando a palestra “**Mapeamento citogenético dos cromossomos 1, 5 e 8 de Vigna spp**”, 2019, Universidade Federal de Pernambuco-Recife.

Moderador, Palestra: Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes, 2019, Universidade Federal de Pernambuco-Recife.